

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
СТУДИСКА ПРОГРАМА ПО ФАРМАЦИЈА



ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**Предвидување на хумана фармакокинетика на коњуиграни
моноклонални антители преку компјутерско моделирање на
фармакокинетика од анимални модели**

***Prediction of human pharmacokinetics of conjugated monoclonal antibodies by
computer modelling of the pharmacokinetics on animal models***

м-р Зана Рустеми

Штип, септември 2021

СОДРЖИНА

Краток извадок	6
Abstract	8
Кратенки/ Abbreviations	10
1. ВОВЕД	
Структура на докторската дисертација	12
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА	
2.1. ФАРМАКОКИНЕТИЧКА И ФАРМАКОДИНАМИЧКА АНАЛИЗА ВО ДИЗАЈНИРАЊЕТО НА НОВИ ЛЕКОВИ	
2.1.1. Општи принципи	13
2.1.2. Просторно моделирање	21
2.1.3. Физиолошки модел на ограничен проток	27
2.2. ФАРМАКОКИНЕТИКА НА КОНЈУГИРАНИТЕ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА	
2.2.1. Антитела – структура и функција	27
2.2.2. Моноклонални антитела	31
2.2.2.1. Химерни моноклонални антитела	32
2.2.2.2. Хуманизирани моноклонални антитела	33
2.2.2.3. Хумани моноклонални антитела	33
2.2.3. Терапевтска примена на моноклоналните антитела	34
2.2.4. Деривати на антитела	36
2.2.5. Конјугирани моноклонални антитела	37
2.2.6. Фармакокинетика и фармакодинамика на моноклонални антитела	43
2.2.7. Физиолошки заснован фармакокинетички модел (РВРК)49	
2.2.8. Други размислувања за предвидување на фармакокинетика на моноклоналните антитела	52
2.2.9. Фармакокинетика на конјугирани моноклонални антитела	54
2.2.10. Ритуксимаб	56
2.2.11. Бифункционални хелаторни агенци	60
2.2.11.1. Ациклични бифункционални хелаторни агенци	62
2.2.11.2. Макроциклични бифункционални хелаторни агенци	64
2.2.11.3. Имуноконјугати	67
2.2.11.4. Радифармацевтски препарати	68
2.2.11.5. Конјугирачки групи	69
2.2.12. Радиообележување на антитела	72
2.2.13. Радиообележување на DTPA-ВМ конјугати	73
2.2.13.1. Термодинамичка стабилност	73
2.2.13.2. Кинетичка интерност	73
2.2.14. Техники за определување на интегритет, чистота како и промени во секундарната структура на Ритуксимаб-имуноконјугати	74
2.2.15. Хроматографија на моноклонални антитела, хелаторни агенци, линери и конјугирани моноклонални антитела	75
2.2.15.1. Течна хроматографија со детекција во ултравиолетовиот регион на спектарот	76
2.3. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ВО ПРЕДВИДУВАЊЕ НА ФАРМАКОКИНЕТИКА НА ЛЕКОВИ	
2.3.1. Улогата на анималните модели во транслациона медицина	77

2.3.2. Ефект на животински видови врз фармакокинетиката	78
2.4. КОМПЈУТЕРСКО МОДЕЛИРАЊЕ НА ФАРМАКОКИНЕТИКА	
2.4.1. Компјутерски програми во симулација на фармакокинетиката и фармакодинамиката на инјектирани антители и нивни конјугати	81
2.4.2. Компјутерски програм Maxsim2 – Физиолошки модели на физиолошко базирано фармакокинетичко моделирање – РВРК	83
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	85
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	86
5. РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО	92
5.1. Прочистување на ритуксимаб од комерцијален производ MabThera®	
5.2. Конјугација на ритуксимаб со 1B4m-DTPA.	93
5.3. Прочистување на имуноконјугат.	94
5.4. Одредување на концентрацијата со UV-VIS спектрофотометрија	95
5.5. Обележување на ритуксимаб - коњугат со нерадиоактивен лутециум	95
5.6. Одредување на чистота и интегритет на имуноконјугатите на ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV	96
5.7. Воведување на анимален модел на стаорец	97
5.8. Определување на интегритетот на имуноконјугатите ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV во примероци на серум од стаорец	99
5.9. Физиолошки модели на физиолошко базирано фармакокинетичко моделирање – РВРК со користење на компјутерски програм Maxsim2	103
6. ДИСКУСИЈА	107
7. ЗАКЛУЧОК	119
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	121

Комисија за утврдување на подобност на тема:

Претседател: **Проф. д-р Елена Дракалска**
вонреден професор
Факултет за Медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“-Штип

Член: **Проф. Д-р Ицко Ѓоргоски**
редовен професор,
Природно-математички факултет, Универзитетот „Св. Кирил и
Методиј“ – Скопје

Ментор: **Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска**
редовен професор,
Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Членови на комисија за оценка и одбрана за докторска дисертација:

Интерен ментор: **Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска**
редовен професор,
Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Екстерен ментор: **Проф. Д-р Ицко Ѓоргоски**
редовен професор,
Природно-математички факултет, Универзитетот „Св. Кирил и
Методиј“ – Скопје

Претседател: **Проф. д-р Елена Дракалска**
вонреден професор
Факултет за Медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“-Штип

Член: **Проф. Д-р Биљана Ѓорѓеска**
редовен професор,
Факултет за Медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Член: **Проф. Д-р Дорентина Беџети**
вонреден професор
Факултет за медицински науки, Државен Универзитет Тетово

Научно поле: Фармација

Научна област: Биофармација, Фармакокинетика и фармакодинамика

Датум на одбрана: -----

Датум на промоција: -----

БЛАГОДАРНОСТ / ACKNOWLEDGMENTS

Длабока и неизмерна благодарност на менторите на докторската дисертација, Проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска и Проф. д-р Ицко Ѓоргоски за несебичната посветеност и професионална академска поддршка во текот на целиот процес на нејзината изработка.

Благодарност до Деканот на Факултетот за медицински науки при Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип, Проф д-р Милка Здравковска, и членовите на комисијата за рецензија и одбрана на докторската дисертација, Проф. д-р Елена Дракалска и Проф. д-р Биљана Ѓорѓеска, кои со своите сугестии, насоки и несебична поддршка го зацврстија квалитетот во изработката на докторската дисертација.

Огромна благодарост за поддршката на Проф. д-р Дорентина Беџети, кој како член на комисијата за оценка на трудот со своите упатства и насоки даде несебичен придонес за текот на истражувањето и оценката на темата на докторската дисертација.

Благодарност до колешката м-р Паулина Апостолова од Факултетот за медицински науки, отсек Фармација од Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип за укажаната помош и поддршка, која со сето свое срце, знаење и умеење ми ја даде при реализацијата на истражувањето.

Од длабочината на срцето му благодарам на мојот сакан сопруг, Омер Рустеми, кој ми беше поддршка при изработката на докторската дисертација.

Неизмерно им благодарам на моите родители, Лејла Кадриу и Др. Фатмир Кадриу, затоа што со својата постојана поддршка и поттик придонесуваат за моите успеси во животот.

Оваа дисертација им ја посветувам на моите деца Парид и Хера за да им биде пример дека кога се сака, со многу љубов од најблиските само небото е граница за успехот. Бескрајно им благодарам затоа што со нивната трпеливост и љубов ме мотивираа да ја завршам докторската дисертација.

Со почит,

Зана Рустеми

Краток извадок

Анималните модели во фармакокинетичката / фармакодинамичката (PK / PD) проценка на конјугираните антители играат важна улога во претклиничките проценки на новите радиофармацевтски препарати, во оптимизирање на дозирањето за оние кои се клинички одобрени и поставување или потврдување оние кои се во фаза на развој.

Разбирањето на фармакокинетиката и биодистрибуцијата на конјугираните антители е еден од критичните чекори за овозможување на нивен успешен развој и употреба. Нивната комплексна структура бара воведување на повеќе биоаналитички методи за дефинирање на нивната структура, стабилност, однесување и судбина на двете компоненти *in vivo*.

Соодветните аналитички методи треба да обезбедат увид во полуживотот и стабилноста во крвта по апликацијата, биодистрибуција во телото, врзување за специфичен рецептор, време и стабилност на врзувањето и присуство на фрагменти како резултат на нивно уништување.

Во нашата работа, ние бевме фокусирани на методот за добивање на конјугирани антители (со користење на ритуксимаб), како и употребата на методот HPLC за нивна идентификација во серумските примероци по интравенска администрација. Трудот ни ги дава првите индикации како добиените експериментални податоци можат да се користат во компјутерска симулација на фармакокинетско однесување на истите имуноконјугати, да се карактеризираат во биолошки матрици и да се дискутираат за техничките предизвици и ограничувања

Ритуксимаб (Mabthera®) е анти-CD20 моноклонално антители што покажа ефикасност кај пациенти со разни лимфоидни малигни заболувања, вклучувајќи индолентни и агресивни форми на не-Хочкинов лимфом на Б-клетки (NHL) и хронична лимфоцитна леукемија на Б-клетки (CLL) . Со цел да се подобри терапевтскиот ефект на моноклоналните антители (mAbs), беше воведен изотоп кој преку специфичен лиганд беше врзан за mAb. За таа цел претходно беше воведена конјугација со хелатна група (p-SCN-Bn-1B4M-DTPA) во протеинскиот ланец.

За фармакокинетичката / фармакодинамичката (PK / PD) проценка на конјугираните антители користевме компјутерско моделирање може да го

оптимизираме дизајнот на клинички испитувања, да се направи проценка на дозата и режимот на потенцијално користење во клинички студии, како и да да помогне во проценка на механизмот на дејство кај луѓето. Преку воведување на компјутерско моделирање може да се предвиди и ефектот во одредени под- популации и подобро да се предвидат можните интеракции.

Сите овие испитувања може да доведат до поефикасен процес на развој на нови лекови, поефикасен третман на болести и персонализирана таргет терапија преку процесот на translација на податоци од предклинички студии.

Од тие причини, пред-клиничките испитувања на животински модели остануваат клучна почетна точка за понатамошни клинички испитувања и се фундаментално значење за разбирање на фармакологија на болести и нови лекови и се од голема помош за предвидување на најсоодветна терапија преку користење на соодветни софтверски програми и предвидување на клинички третман, посебно со биолошки лекови.

Abstract

Animal models in the pharmacokinetic / pharmacodynamic (PK / PD) assay of conjugated antibodies play an important role in preclinical evaluations of new radiopharmaceuticals, in optimizing dosing for those clinically approved and setting or confirming those in development.

Understanding the pharmacokinetics and biodistribution of conjugated antibodies is one of the critical steps in enabling their successful development and use. Their complex structure requires the introduction of multiple bioanalytic methods to define their structure, stability, behavior and fate of both components in vivo.

Appropriate analytical methods should provide insight into the half-life and stability of the blood after application, biodistribution in the body, binding to a specific receptor, time and stability of binding, and the presence of fragments as a result of their destruction.

In our work we are focused on the method for obtaining conjugated antibodies (rituximab) as well as the use of the HPLC method for their identification in serum samples after intravenous administration. The paper gives us the first indications how the obtained experimental data can be used in the computer simulation of the pharmacokinetic behavior of the same immunoconjugates, to be characterized in biological matrices and to discuss the technical challenges and limitations.

Rituximab (Mabthera®) is an anti-CD20 monoclonal antibody that has demonstrated efficacy in patients with various lymphoid malignancies, including indolent and aggressive forms of B-cell non-Hodgkin s lymphoma (NHL) and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). In order to enhance the therapeutic effect of monoclonal antibodies (mAbs), an isotope was introduced which was ligated to mAb via a specific ligand. For this purpose, conjugation with a chelate group (p-SCN-Bn-1B4M-DTPA) was previously introduced into the protein chain.

For the pharmacokinetic / pharmacodynamic (PK / PD) assessment of conjugated antibodies we used computer modeling to optimize the design of clinical trials, to assess the dose and mode of potential use in clinical trials, and to assist in assessing the mechanism of action in humans. By introducing computer modeling, the effect in certain sub-populations can be predicted and possible interactions can be better predicted.

All of these investigations can lead to a more efficient process of developing new drugs, more effective treatment of diseases, and personalized target therapy through the process of translating data from preclinical studies.

Therefore, pre-clinical trials of animal models remain a key starting point for further clinical trials and are fundamental to understanding the pharmacology of disease and new drugs and are of great help in predicting the most appropriate therapy through the use of appropriate software programs and of clinical treatment, especially with biological drugs.

Кратенки/ Abbreviations

Lu - Lutetium, Лутецијум

ACN - Acetonitrile, Ацетонитрил

ACR/BIS - acrylamide / bisacrylamide, Акриламид / бисакриламид

ADCC - Antibody- dependent cellular cytotoxicity, Антитело-зависна клеточна цитотоксичност

ATP - Adenosine triphosphate, Аденозин трифосфат

B-NHL - B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Б-клеточен Хочкин лимфом **BFCA** - Bifunctional chelating agent, Бифункционален хелатирачки агенс

CTLA-4 - Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Цитотоксичен протеин 4 поврзан со Т-лимфоцити

ДНК - Deoxyribonucleic acid, Дезоксирибонуклеинска киселина

Fab - Fragment antigen-binding, Антиген-врзувачки фрагментат **FDA** - Food and drug administration, Управа за храна и лекови на САД

HAMA - Human anti-mouse antibody, Хумани анти-гљувчешки антитела

HPLC-UV - High performance liquid chromatography ultraviolet, Течна хроматографија под висок притисок со детекција во ултравиолетова област на спектарот

IgG - Immunoglobulin G, Имуноглобулин G

mAb - Monoclonal antibody, Моноклонално антитело mm - Milimeter, Милиметар

µm - Micrometer, Микрометар

NaCl - Natrium chloride, Натриум хлорид

PBS - Phosphate buffer saline, Фосфатен пуфер

p-SCN-Bn-1B4M-DTPA - (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-6-methyl-diethylene-triamine pentaacetic acid, (2-(4-изо тиоцианато бензил)-6-метил-диетилен-три амин пентаоцетна киселина)

QC - Quality control, Контрола на квалитет

RIT - Radioimmunotherapy, Радиоимунотерапија

Tyr - Tyrosine, Тирозин

USP - United States Pharmacopeia, Фармакопеја на Соединетите Американски Држави

UV/VIS - Ultraviolet/Visible, Ултравиолетов/Видлив

TMA - Therapeutic monoclonal antibody, Терапевтско моноклонално антитело

SEC - Size exclusion chromatography, Хроматографија со исклучување на големина

AUC - Area under the plasma/serum concentration-time curve, Површина под кривата во плазма/серум во функција на концентрација и време

CL - Clearance, Клиренс

Clint - Internal clearance, Внатрешен клиренс

CLH - Hepatic clearance, Хепатичен клиренс

Cmax - Maximum concentration, Максимална концентрација

Cmin - Minimum concentration, Минимална концентрација

Fm - Metabolic clearance fraction, Фракција на клиренс по метаболички пат

Fu - Unbound fraction of the drug, Неврзана фракција на лекот

Fugut - Unbound fraction in intestines (enterocytes), Неврзана фракција во црева (ентероцити)

Ka - Absorption rate constant, Константа на стапка на апсорбција

Kdeg - Constant rate of degradation, Константа на стапка на деградација

Km - Michaelis Menten constant / Константа на Michaelis Menten

t1/2 - Elimination half-life, Полуживот на елиминација

tmax - Time to reach Cmax, Време да се постигне Cmax

Vmax - Maximum initial rate of metabolism / conversion / Максимална почетна стапка на метаболизам / конверзија

KPBr – Brain Partition Coefficient, Коефициент на партиција на мозок
KPM – Muscle Partition Coefficient, Коефициент на партиција на мускул
KPG – Gut Partition Coefficient, Коефициент на партиција Црева
KPH – Liver Partition Coefficient, Коефициент на партиција на црн дроб
KPR – Kidney Partition Coefficient, Коефициент на партиција на бубрези
KA – First order absorption rate constant from GIT to plasma, Прв ред константна стапка на апсорбција од ГИТ во плазма
fA – Fraction absorbed (used as extent of bioavailability for compartment models), Апсорбирана фракција (се користи како степен на биорасположивост за просторни модели)
CLiR – Clearance of Kidney, Клиренс на бубрези
CLiH – Intrinsic clearance terms, Внатрешен клиренс
A – Amount of drug in the gastrointestinal tract, Количината на лекот во ГИТ (mg/ μ mol)
ind – Index that identifies the corresponding tissue, Индекс што го идентификува соодветното ткиво
CP – Plasma concentration, Плазма концентрација
CT – Peripheral compartment concentration, Концентрација на периферичен компартман
PBPK- Physiologically based pharmacokinetics, Физиолошко базирана фармакокинетика
PK/PD – Pharmacokinetics / pharmacodynamics, Фармакокинетика / фармакодинамика
TMDD – Target mediated drug disposition, Таргет посредувана диспозиција на лек
CL – Ligand concentration, Концентрација на лиганд (μ g/L⁻¹, μ mol⁻¹)
CR – Target concentration, Концентрација на таргетот (целта) (μ g/L⁻¹)
CRL – Receptor-ligand complex concentration, Концентрација на комплексот рецептор-лиганд (μ g/L⁻¹)
RO – Target (target) initial concentration, Целна (таргет) почетна концентрација
kdeg - First order fractional receptor turnover rate constant, Константна стапка на промет на фракциони рецептори од прв ред
VT – Volume of the tissue compartment, Волумен на ткивниот компартман
VC – Volume of central apartment, Волумен на централен компартман
kon – Receptor-ligand complex second order on-rate constant, Комплекс на рецептор-лиганд од константна стапка од втор ред
koff – Receptor-ligand complex first order off-rate constant, Рецептор-лиганд комплекс од прв ред вон-стапка на константа
ke (RL) – First order receptor-ligand complex elimination rate constant, Константа на стапка на елиминација на рецептор-лиганд од прв ред
Cld – Spatial expression for distribution, Просторен израз за дистрибуција
ADME- Absorption, Distribution, Metabolism and Elimination, Апсорбција, Дистрибуција, Метаболизам и Елиминација

1. ВОВЕД

Структура на докторската дисертација

Преку изработката на оваа студија и добиените резултати очекуваме да се зголеми веродостојноста во користењето на компјутерски програми за моделирање на однесувањето конјугирани моноклонални антители по нивната апликација, како и улогата на анималните модели во транслационата медицина.

Потребата да се разберат последиците од апликацијата на одреден лек во даден организам е голем проблем во фармацевтските и токсиколошките истражувања.

Не е тешко да се разбере кога ефектите се набљудуваат и се видливи и кога постои врска помеѓу дозата на лекот и неговиот ефект. Потешкотијата во предвидување на таков ефект, без оглед дали е корисен или штетен, главно произлегува од фактот кога во предизвикување на ефектот се вклучени голем број комплексни механизми, од влегувањето на лекот во телото до неговото излучување.

За да се разбере и квантифицира оваа врска и да може да се предвидат ефектите, неопходно е да се знае главниот вклучен биолошки механизам и да постои можност да се предложат соодветни математички модели.

Фармакокинетиката, фармакодинамиката и системската биологија се научни дисциплини што можат да одговорат на потребата да се направи модел на однесувањето на една молекула, потенцијален лек во организмот, да се објасни фармаколошкото и/или несаканото дејство и да се предвиди дозата со која тоа може да се постигне.

Фармакокинетичките модели се користат за да се опише временската диспозиција и апсорпција на супстанцијата во живиот систем. За медицински цели, фармакокинетиката може да се користи за да се проценат оптималните режими на дозирање на лекови во различни терапевтски ситуации.

Воглавно се користат три главни пристапи за да се анализира концентрацијата-време на однесување на лекови. Класичниот пристап опфаќа или (I) збир на експоненцијали, објаснети како емпириски модели, или (II) модели на простори, компартмани. Иако емпириските и просторните, компартмански модели имаат предност затоа што се едноставни и ги задоволуваат потребите на повеќето фармакокинетички студии, тие не ги опишуваат разликите на концентрациите во поединечните ткива во физиолошките систем, ефектот на изменета перфузија, отпорност на мембрана или промени во врзување на протеини. Ограничувањата на овие класични фармакокинетички модели доведоа до потреба од воведување

на пореален начин на моделирање, имено, (III) воведување на модели на физиолошки проток. Општ пристап во физиолошкото моделирање е да се дефинираат фармакокинетичките процеси со помош на физиолошки, анатомски и биохемиски значајни параметри. Секој орган е претставен со еден или повеќе простори, компартмани каде што секој простор на васкуларното ткиво е меѓусебно поврзан преку циркулаторниот систем како во телото.

Овој мултидисциплинарен пристап комбинира различни нивоа на информации (експериментални податоци, хемиски и биолошки знаења, претпоставки), како и математички модели, а се со цел да се разбере како работи комплексниот биолошки систем (организам).

За да се опише однесувањето и судбината на лекот во организмот, потребно е да се дефинираат модели кои математички даваат врска помеѓу „влезните“ податоци за лекот (применета доза или режим на дозирање) и „излезните“ податоци (концентрација или ефект на дрога) во функција на времето. Во последниве години, популацискиот пристап кон анализата на фармакокинетичката (PK), фармакодинамичката (PD), како и податоците на PK/PD стана сè поважен. Анализата на населението обезбеди единствен модел за популацијата на субјектите, вредностите на популацијата на параметрите на PK и / или PD, но исто така и степенот на нивната варијабилност.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2.1. ФАРМАКОКИНЕТИЧКА И ФАРМАКОДИНАМИЧКА АНАЛИЗА ВО ДИЗАЈНИРАЊЕТО НА НОВИ ЛЕКОВИ

2.1.1. Општи принципи

Фармакокинетиката опишува како организмот влијае на специфичен лек после негова администрација преку механизмите на апсорпција и дистрибуција, на метаболичките промени кои се случуваат во организмот, како и на ефектите и патиштата на екскреција.

Фармакокинетските особини на лековите зависат од патот на администрација и дозата. Тие може да влијаат на брзината на апсорпција.

Апсорпцијата се однесува на апсорпција на лекот. Лекот кој се зема поминува од местото на администрација (на пример, гастроинтестиналниот тракт, мускулите) во крвта, која го дистрибуира во телото и обезбедува негов пристап во различни ткива, органи и системи. Брзината и комплетноста на присутноста на лекот ја карактеризираат неговата биорасположливост (параметарот на

фармакокинетиката која покажува кој дел од лекот достигнува во системскиот проток). Секако, со интравенска и интраартеријална администрација, лековитата супстанција навлегува во крвотокот веднаш и целосно, а нејзината биорасположивост е 100%.

При апсорпцијата која следи после ослободувањето на лекот од дозираната форма, тој мора да помине низ клеточните мембрани на кожата, мукозните мембрани, сидовите на капиларите и стигне до клеточните структури. Во зависност од својствата на лекот и бариерите преку кои се пробива, како и од начинот на администрација, сите механизми на преминување на лекот може да се поделат на четири главни типови: дифузија (пенетрација на молекули поради термичко движење), филтрирање (минувајќи молекули преку пори под притисок), активен транспорт (трансфер со трошоци за енергија) и осмоза. Истите транспортни механизми преку мембрани се вклучени во дистрибуцијата на лекови во телото, и кога тие се елиминираат.

Дистрибуција е навлегување на лекот во различни органи, ткива и телесни течности. Стапката на фармаколошкиот ефект, интензитетот и времетраењето зависи од дистрибуцијата на лекот во телото. За да започне со дејство, лековитата супстанција мора да се концентрира на вистинското место во доволни количини и да остане таму долго време.

Во повеќето случаи, лекот е нерамномерно и/или спонтано дистрибуиран во различни ткива така да неговите концентрации се разликуваат 10 или повеќе пати. Нееднаквата дистрибуција на лекот во ткивата се должи на разликите во пропустливоста на биолошките бариери/мембрани, интензитетот на снабдувањето со крв на ткивата и органите. Клеточните мембрани се главната пречка на патот на молекулите на активната компонента на лекот до местото на дејствување. Разни ткива имаат обично збир на мембрани со различен "пропусен опсег". Сидовите на капиларите најлесно се поминуваат, додека најтешките бариери се оние меѓу крвта и ткивата на мозокот и на крвта и плацентата.

Во васкуларниот систем, лековата супстанција е во поголема или помала мерка врзана за плазма протеините. Комплексите "протеини + лек" не се во можност да "поминат" низ сидот на капиларите. По правило, врзувањето за протеините во плазмата е реверзибилно и доведува до забавување на ефектот и зголемување на времетраењето на лекот.

Нерамната дистрибуција на лековите во телото често предизвикува несакани ефекти и затоа е неопходно да се знае како да се контролира дистрибуцијата на

лековите во човечкото тело. Заради ова многу е значајно да се знае дали некој лек потенцијално се акумулира во дадено ткиво или орган, дали има специфично и целно место на дејство, но и кои ткива и/или органи неспецифично го акумулираат и да доведе до несакани ефекти. Видот на дозираната форма е исто така критичен параметар и е неопходен за дејство на активната лековита супстанца.

Метаболизам - Биотрансформација на лекот со формирање на еден или повеќе метаболити. Дел од лековите дејствуваат во телото и се излучуваат непроменети, а дел од нив е подложен на биотрансформација. Различни органи и ткива се вклучени во биотрансформацијата на лековитите супстанции во човечкиот и воопшто живиот организам, како црниот дроб, белите дробови, кожа, бубрези, плацента. Најактивните процеси на биотрансформација на лековите се одвиваат во црниот дроб, кој е одговорен за нивната детоксикација, претставува бариера и има голем број на екскреторни функции.

Може да се разликуваат две главни насоки на биотрансформација на лековите - метаболна трансформација (метаболни процеси на фаза 1 од метаболизам на лекови) и конјугација (метаболни процеси на фаза 2 од метаболизам на лекови). Метаболната трансформација вклучува механизми на оксидација, редукција или хидролиза на активните лековити супстанции, додека процесите на конјугацијата вклучуваат биохемиски процеси, во кои се вклучени голем број на ензимски системи. Како резултат на метаболната трансформација и конјугација, лековите обично се менуваат или целосно им се одзема нивната фармаколошка активност. Метаболизмот или биотрансформацијата на лекот често водат кон конверзија на супстанции растворливи во масти во поларни форми и стануваат конечно растворливи во вода. Овие метаболити се помалку биолошки активни, а биотрансформациите ја олеснува нивната екскреција со урина или жолчка.

Екскреција – е процес на отстранувањето на лековите од телото откако тие се делумно или целосно претворени во метаболити растворливи во вода (некои лекови се излучуваат непроменети). Екскрецијата на лековите се врши со урина, жолчка, издишан воздух, млеко, измет или плунка.

Повеќето лекови или метаболити растворливи во вода се отстрануваат преку бубрезите. Филтрирањето е главниот механизам на екскреција со лековите преку бубрези, посебно за оние кои не се врзани со плазма протеините. Секрецијата е активен процес (со значителна енергија и учество на специјални транспортни системи). Репсорпција има на гликоза, аминокиселини, катјони и анјони како активен процес и на масти и растворливи супстанции – како пасивен процес.

Односот помеѓу обемот на дистрибуција и клиренсот на супстанцијата е изразена со периодот на полуживот ($T_{1/2}$). Полуживотот на супстанцијата е време за кое неговата концентрација во крвната плазма е намалена за половина.

Главната задача на фармакокинетиката е да се идентификуваат зависностите помеѓу концентрацијата на лекот или неговите метаболити метаболити во биолошки течности и ткива и потенцијалниот фармаколошки ефект.

Движењето на лекот во телото е сложен процес. Затоа е потребно развивање на фармакокинетички модели кои претставуваат точни алатки за изразување и пресметување на математичките фармакокинетички параметри во телото. Основите на фармакокинетичко моделирање го дефинираат организмот како еден простор (компарتمان) или како повеќе простори, кои меѓусебно се поврзани со процеси со различна брзина. При просторното моделирање организмот е составен од повеќе фармакокинетички модели кои се замислени како не-анатомски или физиолошки поделби, и исполнуваат два главни критериума:

1. имаат иста перфузија на крв во ткивата или органите
2. имаат исти главни физичко-хемиски карактеристики на лекот.

Една од најважните постапки во раната фаза на дизајнирање на еден лек е да се воспостават основните принципи и хипотези на PK / PD. Мора да се внимава да се анализираат податоците, да се извлечат прави заклучоци и да се утврди работна хипотеза што може да се тестира со последователен дизајн на студијата. На крајот на краиштата, целта со студиите кои користат референтна супстанца или лек е да ги разберат движечките сили за одговор, т.е. односите помеѓу концентрацијата на лекот и вредностите на фармакодинамиката. Препорачливо е да се постави PK/PD модел преку користење на најрелевантната матрица (на пример, крв/плазма или целно ткиво) бидејќи на таков начин ќе даде јасна дефинирана врска на доза-одговор. Откако ќе се потврди PK/PD моделот, треба да утврди дали податоците можат да бидат екстраполирани на идните молекули.

Примената на моделирање и симулација на однесувањето на еден лек во организмот претставува голем предизвик во неговиот развој и примена во клиничките испитувања. Преку ова може да се дојде до:

1) Најдобар режим на дозирање

Се набљудува однесувањето на лекот кај пациенти, се предвидува концентрацијата на лекот во различни телесни течности со секој режим на дозирање и пресметување на оптималниот режим на дозирање за специфични пациенти. Предвидува криви на концентрација на повеќе дози од експеримент со една доза.

- 2) Предвидување на токсичност
- 3) Проценка на ризик за токсичност со одредени режими на дозирање
- 4) Корелација на концентрацијата на лекот во плазмата со фармаколошки одговор
- 5) Евалуација на биеквиваленцијата и нееквивалентноста помеѓу различните формулации на истиот лек.
- 6) Одредени несакани реакции (оштетување)

Проценка на можната акумулација на лекови и метаболити во телото и утврдување на влијанието на променетата физиолошка состојба или болест врз апсорпцијата, дистрибуцијата, метаболизмот и излучувањето на лековите.

- 7) Предвидување на лек-лек интеракција

Фармакокинетичките и фармакодинамичките модели (PBPK) обезбедуваат информации за профилите на одделни ткива и органи и користат математички равенки за да опишат како супстанциите се апсорбираат, дистрибуираат, метаболизираат и се излучуваат со текот на времето (IPCS, 2010; Krishnan et al., 2010; Johanson, 2014).

Преку познавање на анатомската градба, физиолошките механизми и кинетиката на супстанциите, математичкиот модел може да ја предвиди внатрешната доза на супстанцијата врз основа на информации за надворешно изложување. Моделите PBPK исто така овозможуваат екстраполација меѓу видови, каде што наодите од животни може да се искористат и за луѓето без дополнително тестирање. Всушност, моделите PBPK се користат за развој на лекови, дизајни на тестови за токсичност на животни и проценки на ризици по здравјето на луѓето. Покрај тоа, моделите PBPK се корисни за екстраполација помеѓу видовите, дозите и патиштата на изложеност. PBPK моделот е структуриран во простори (компарتمани) кои претставуваат органи (IPCS, 2010; Krishnan et al., 2010; Johanson, 2014). Секој простор е организиран во биолошки релевантна позиција и просторите се меѓусебно поврзани преку масовен транспорт кои постои меѓу нив. Колку простори се користат и како истите се структурирани, се определува преку наменетата на моделот и познавањата за супстанцијата/ите од интерес. Типично, моделот вклучува одделни простори за целни ткива, ткива со биотрансформација и клиренс и ткива за складирање. За да се избегне присуството на прекумерен број на параметри, да се намали времето на пресметување, комплексноста на моделот треба да се минимизира. Здружување на органи е еден од начините да се направи тоа, каде што ткивата со слични својства, како проток на крв и распределба, се соединиваат во заеднички простор. Супстанциите навлегуваат во системот преку

различни патишта на администрација како што се вдишување, инјектирање во крв, кожен контакт и / или орална апликација преку органите за варење. За да стигнат во циркулација и понатаму се транспортираат до крајните органи, супстанциите би требало да поминат повеќе бариери. Преминувањето на бариерите се случува со активни или пасивни процеси. Откако ќе се апсорбираат, супстанциите се дистрибуираат до органите преку циркулација. Во органите, супстанциите се движат во ткивото, феномен кој често се опишува со диференцијални равенки на масовна рамнотежа од прв ред или со ограничени процеси на перфузија и дифузија. Распределбата на супстанциите помеѓу крвта и ткивото може да се опише со коефициент на поделба, што претпоставува добро разработен процес. Клиренсот се јавува кај органи како што се црниот дроб и бубрезите и може да вклучува и метаболизам на истите. За да овој пристап биде ефективен, треба да постои врска помеѓу концентрациите и одговорот на лекот. Во некои случаи одговорот е директен и реверзибилен и може да се примени равенката на Хил (Lalonde, R.L, 2006) или негова варијација. Во други случаи, реверзибилниот одговор може да биде индиректен, често со потребна низа настани. Исто така е можно лекот да даде неповратен одговор.

Директни реверзибилни ефекти

Примери за директни реверзибилни ефекти може да вклучуваат контрола на крвниот притисок или мускулна релаксација. За многу лекови, одговорот е директно поврзан со концентрацијата на лекот на местото на рецепторот, што пак е поврзано со концентрацијата во плазмата. Како што се зголемува концентрацијата на рецепторите, така се зголемува и одговорот и со помала концентрација одговорот опаѓа.



Општо земено, рецепторот може да биде „математички“ во централниот простор, периферна периферниот или одделен ефектен простор. Во секој случај, односот помеѓу концентрацијата на рецепторот и одговорот може да се опише со Сигмоидниот E_{\max} модел (равенка на Hill):

$$\text{Одговор} = E_{\max} \times C^y_R / C^{y_R}_{50\%} + C^y_R,$$

за Сигмоидниот E_{\max} одговор наспроти концентрација, C_R и

$$\text{Одговор} = \text{основен одговор} \pm E_{\max} \times C^y_R / C^{y_R}_{50\%} + C^y_R,$$

за Сигмоидниот E_{\max} одговор наспроти концентрација, C_R со основен одговор

Моделот вклучува параметри кои се физиолошки засновани или специфични за супстанции и се типично изведени од литература, експерименти или проценети

според моделот (IPCS, 2010; Krishnan et al., 2010; Johanson, 2014). Тежината на телото и органот, протокот на крв и стапката на вентилација се примери на физички параметри, додека стапката на поделба и метаболизмот се примери на параметрите специфични за супстанциите.

Оптимизирање на перформансите на PBPK моделот е повторувачки процес (IPCS, 2010; Krishnan et al., 2010; Johanson, 2014). Процесот започнува со споредување и предвидувања на експериментални податоци од студиите на биодистрибуција, а потоа и воспоставување на модел, ако тие не се сообрази. Сообразноста вклучува прилагодување на структурата на моделот и / или оптимизација на параметрите, а се со цел да се обезбеди најдобро вклопување на предвидувањата и експерименталните набудувања. За време на овој процес на валидација, перформансите на калибрираниот модел се проценуваат со споредување на предвидувањата на моделот со надворешни податоци, т.е. податоци што не се користат за калибрација. Перформансите на моделот се оценуваат преку визуелна инспекција и / или критериуми за соодветност, како што се, коефициент на определување (R^2), максимална веројатност за најавување и критериум за информации Akaike.

За да се идентификуваат параметрите на моделот кои најмногу влијаат врз резултатот на моделот, се вршат анализи на чувствителност (IPCS, 2010; Krishnan et al., 2010; Johanson, 2014). Ова е важно бидејќи малата промена во чувствителниот параметар ќе има големо влијание врз точноста на излезот. Анализата на чувствителност е квантитативна проценка, каде промената во одговорот / излезот се мери како резултат на промена на влезниот параметар. Промена на еден параметар одеднаш се нарекува анализа на локална чувствителност. Локалната анализа на чувствителност има ограничување дека коваријациите и интеракциите помеѓу параметрите не можат да се проценат. Со истовремено менување на повеќе параметри, ваквите односи можат да се проценат. Ова се нарекува глобална анализа на чувствителност. Сепак, глобалната анализа на чувствителност бара моќен компјутерски процесор, кој честопати ја ограничува неговата употребливост.

Моделирањето на PK/PD е важен пристап за интегрирање на квантитативни информации за фармаколошките својства на едно соединение заедно со неговата фармакокинетика. Дизајнот на една рационална студија се заснова на претпоставка за врска помеѓу изложеноста на лек и неговата терапевтска активност. Таквите односи се генерално сложени. Затоа е важно да се дизајнираат

робусни претклинички студии кои ќе обезбедат информации за изградба на механистички релевантни математички модели на PK/PD. Како што податоците стануваат достапни, првичните модели можат да се прецизираат преку повторувачки процес. Крајниот излез од ова истражување треба да биде моќна алатка за предвидување заснована на длабинско разбирање на барањата за ефикасност. Добро дизајнираната студија PK/PD нуди рационален пристап кон ефикасен и информативен развој на лекови и може да му помогне на истражувачкиот тим да го разбере механизмот на дејство на лекот и да го избере оптималното соединение. Со примена на PK/PD моделирање во раните програми за откривање и развој може да се минимизира употребата на животни, да се скрати времето на развој, да се процени терапевтскиот индекс и да се предвидат опсезите на дозата при рано клиничко тестирање. PK/PD моделите овозможуваат интеграција на податоците од различни студии на логичен начин заснован на разбирање на лекот и болеста. Откривањето и развојот на лекови може да се гледа како модел за градење вежба за време на која знаењето за нови соединенија постојано се ажурира и се користи за информирање на стратегијата за донесување одлуки и развој на лекови (Лалонд и сор., 2007).

Фармакокинетиката вклучува проучување на процесите кои влијаат на плазматската концентрација на лекот во кое било време по администрација на доза. Обично, најголемо внимание предизвикуваат плазматските концентрации и може да се гледаат како одговор на дозата на лек што е администриран во функција на времето.

Концентрацијата во кое било време е контролирана од големината на дозата и процесите на апсорпција, дистрибуција, метаболизам и екскреција на лекот (АДМЕ) и истите може да се одвиваат во исто време. Од тука, математичката равенка за временскиот тек на плазматските концентрации мора да ги содржи и дозата и стапките на секој од овие процеси.

Физиолошки базирана фармакокинетика (PBPK) користи реален модел на органи за да ја опише кинетиката на лекот. Размената на крвно-ткиво на секој орган се карактеризира со неговиот волумен, перфузија, метаболизам, пропустливост на капиларите и коефициент на поделба на крв/ткиво.

PBPK моделирање претставува идеален пристап за запознавање со зависноста на фармакокинетиката од интеракцијата помеѓу физички/хемиски својства на лекот и физиологијата.

Најважната примена на PBPK моделирање е во областа на токсикокинетиката и

проценката на ризикот врз животната средина, каде што е од суштинско значење да се симулираат локалните концентрации на ткивата под различни услови на изложеност (на пример, одмор, вежбање итн.). За оваа анализа, моделот РВРК мора да може да симулира временски зависни промени во физиолошките параметри (на пр. стапка на вентилација, срцев излез, мускулен проток на крв).

2.1.2. Просторно моделирање

За да се опише однесувањето и судбината на лекот во организмот, потребно е да се дефинираат модели кои математички ја даваат врската помеѓу „влезните“ податоци за лекот (применета доза или режим на дозирање) и „излезните“ податоци (концентрација или ефект на лек) како функција на времето.

Постојат различни пристапи за анализа на податоците во фармакокинетиката (РК), и кој од нив ќе се користи зависи од целта на анализата, видот на податоците, начинот на нивно добивање, карактеристиките на применетиот лек. Просторната (модел-зависна, компартманска) анализа, во споредба со другите пристапи, е од фундаментално значење при анализата на податоците на РК.

Најчесто користените модели за опишување на дејството на лекот се: модел на фиксен ефект, линеарен, лог-линеарен, хиперболичен $E_{\text{макс}}$, сигмоиден модел $E_{\text{макс}}$. Особено се издвојуваат моделите РК/PD, кои ја поврзуваат примената доза со дејството на лекот и како такви ги обединуваат обете фармаколошки единици. Ова се исклучително сложени модели чија цел е да ги идентификуваат клучните својства на лекот што ќе овозможи квантификација и предвидување на временскиот тек на лекот под физиолошки и патолошки услови. Процесот на моделирање се заснова на употреба на податоци добиени за време на тестот со цел да се утврдат функциите кои најдобро ги предвидуваат „излезните“ информации и ги проценуваат параметрите на моделот. Најважните параметри на моделот РК се: константна стапка на ресорпција, клиренс и волумен на дистрибуција на лекот, додека кај PD се : максималниот ефект на лекот ($E_{\text{макс}}$), плазматска концентрација на лекот при кој се постигнува 50% од максималниот ефект (EC_{50}), коефициент на наклон на линијата што ја покажува врската помеѓу концентрацијата на лекот и одговорот, Hill-ов коефициент на нагиб што укажува на наклонот на кривата на сигмоиден модел (γ).

Кинетиката на повеќето лекови е опишана како хипотетички модел кој се состои од еден, два или повеќе функционални простори, компартмани организирани во серија или паралелни едни со други. Исто така се претпоставува дека брзината на

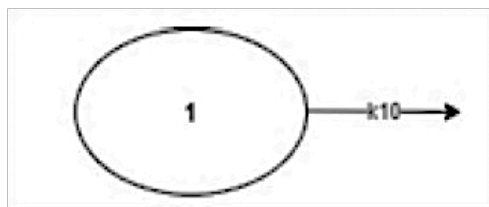
движење на лекот помеѓу просторите ја следи кинетиката од прв ред.

Во зависност од тоа како се организирани моделите, тие се поделени во две главни категории: мамиларен модел и физиолошки модел.

Мамиларниот е најчестиот компартмански модел што се користи во фармакокинетиката. Се состои од еден или повеќе периферни компартмани поврзани со централниот компартман. Централниот компартман вклучува плазма и високо перфузирани ткива, како што се белите дробови, црниот дроб, бубрезите, итн., Кои многу брзо достигнуваат состојба на рамнотежа со лекот. Лекот се апсорбира директно од овој компартман (крв). Екскрецијата се одвива и во овој компартман каде што главните органи кои учествуваат во излучувањето на лекот се црниот дроб и бубрезите, високо перфузирани ткива и затоа се претпоставува дека тие брзо се стигнуваат со лекови во системската циркулација.

Периферни или ткивни компартмани (нумерирани) се оние компартмани со слаба васкуларизација. Дистрибуцијата на лекот во овие компартмани се реализира преку крв.

Движењето на лекот помеѓу компартманите се карактеризира со константа на брзина на реакциите од прв ред означени со буквата k . Броевите k_{12} или k_{21} ја означуваат насоката на движење на лекот. k_{12} се однесува на движењето на лекот од компартман 1 во компартман 2 и обратно k_{21} .



Слика 1. Едно просторен модел на интравенска апликација
One compartment model of intravenous application

Едно компартманскиот модел IV, како болус: се користи за опишување на нивото на плазма по употреба на единечна доза на лекот. На инјектираниот лек како болус му треба една до три минути целосно да заврши во општата циркулација и затоа стапката на апсорпција во циркулацијата не се зема предвид.

$$\frac{dX}{dt} = -\text{стапка на елиминација}$$

$$\frac{dX}{dt} = -k_{el}X$$

(-) - негативниот знак покажува дека лекот е отстранет од телото.

k_{el} - за администриран лек како IV болус, предмет на кинетика на едно компартманскиот модел, каде што намалувањето на плазматската концентрација

на лекот е предизвикана од процесот на екскреција од организмот или елиминационата фаза.

Елиминационата фаза се карактеризира од три параметри: константа на стапка на елиминација, полуживот на елиминација и клиренс.

$$X = X_0 e^{-k_{el} t}$$

Равенката покажува дека достапноста на лекот што е предмет на кинетика на едно компартманскиот модел е моноекспоненцијална.

Полуживот на елиминација е најважниот фармакокинетски параметар на лекот. Се дефинира како време потребно количината на лекот во организам и плазматската концентрација да се намали на пола или 50% од почетната вредност. Единицата мерка е изразена во мин или час.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{el}}$$

Евалуацијата на физиолошките фармакокинетски параметри е зголемена и во овие услови, така да полуживотот е бинарен параметар кој зависи од некои примарни параметри, како што се: дозвола и обем на дистрибуција дадени со следната равенка:

$$t_{1/2} = \frac{0.693 V_d}{CL_p}$$

V_d – Волумен на Дистрибуција е мерка, што укажува на степенот на дистрибуција на лекот и се изразува во литри.

Оваа равенка може да се примени само на лекови кои се подложени на кинетика на едно компартмански модел. Тоа е затоа што, V_d може да се процени кога ќе се постигне рамнотежа на дистрибуција на лекот помеѓу плазмата и ткивата и таквата рамнотежа е веднаш поставена за лек што е предмет на едно компартманска кинетика.

$$V_d = \frac{X_0}{k_{el} AUC}$$

Општ метод што може да се примени на повеќе компартмански модели со цел да се оцени V_d е:

$$V_d = \frac{FX_o}{kel AUC}$$

X_o – користена доза

F – фракција на лекот апсорбиран во системската циркулација. $F=1$ што значи целосна достапност кога лекот се користи интравенски.

CL - клиренс се дефинира како теоретски волумен на телесната течност што содржи лек, од кој лекот се отстранува во одреден временски период. Клиренсот во одреден орган се нарекува клиренс на орган. Може да се процени со делење на стапката на екскреција од секој орган со концентрацијата на лекот во него.

Ренален клиренс

$$CL_r = \frac{\text{стапка на елиминација на лекот од бубрези}}{C}$$

Хепатичен клиренс

$$CL_H = \frac{\text{стапка на елиминација на лекот од црн дроб}}{C}$$

Општ клиренс

$$CL_p = CL_r + CL_H + CL$$

$$\text{други } CL = kel V_d$$

$$kel = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$
$$CL = \frac{0.693 V_d}{t_{1/2}}$$

Идентични равенки може да се напишат за CL_r и CL_H во услови кога $t_{1/2}$ е непроменет, а екскрециите на бубрезите и метаболизмот имаат ист полуживот.

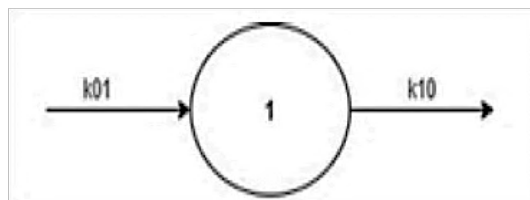
Некомпартманскиот метод за пресметување на вкупниот клиренс за лек што е предмет на кинетиката на еднокомпартманскиот моделот е прикажан:

За IV лекови, болус:

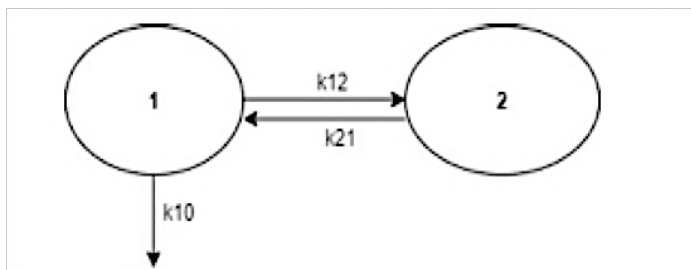
$$CL_p = \frac{X_o}{AUC}$$

За IV болус, ренален клиренс може да се процени со утврдување на вкупната количина на непроменет лек што се излучува во урината, како на X_u^∞ и AUC :

$$CLr = \frac{X_u^\infty}{AUC} 1$$

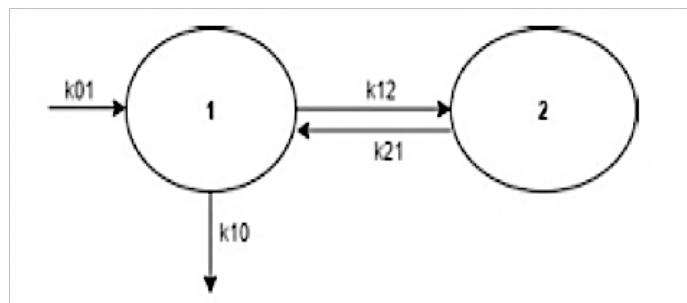


Слика 2. Еднопросторен модел кај перорална и ректална администрација
One compartment model of oral and rectal administration

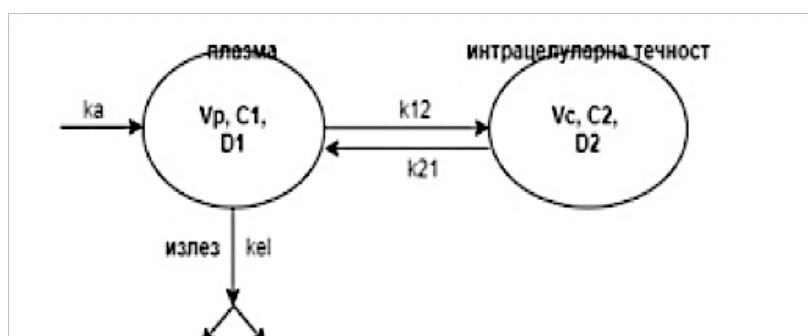


Слика 3. Двопросторен модел кај интравенска администрација
Two compartment model of intravenous application

Во времето нула, целата доза се наоѓа во телото. Распределбата низ ткивата што го сочинуваат централниот простор е толку брза што може да се смета за моментална, но дистрибуцијата до ткивата на периферниот оддел е побавна. Елиминација е процес од прв ред (k_{10}), што се јавува од централниот компартман. Дистрибуција (k_{12}) и редистрибуција (k_{21}).



Слика 4. Двопросторен модел кај перорална и ректална администрација
Two compartment model of oral and rectal administration



Слика 5. Модел на простори во серија
Compartment model in series

K_a – фармакокинетската константа на стапката на влегување на лекот во компартманот
 K_{el} – фармакокинетска константа на екскреција на лекови од компартманот
 V_p – волумен на лек во плазма
 V_c – волумен на интрацелуларна течност
 C_1 – концентрација на лекот во 1 компартман
 C_2 – концентрација на лекот во 2 компартман
 D – лекот
 D_1 – количина на лекот во 1 компартман
 D_2 – количина на лекот во 2 компартман

Предноста на просторниот, компартмански модел е што овозможува да се претстави преку диференцијални равенки за секој од овие процеси, а со цел да ги опише промените на лековите во секој поединечен простор. Корисен е и да се предвиди профилот на концентрација на лек - време, во нормални физиолошки или патолошки услови. Недостаток на овој модел е што моделот може да се примени само на одреден лек во студијата и има потешкотии кои се јавуваат при користење модели за толкување на разликите помеѓу резултатите во експерименти врз луѓе и животни. Откако ќе се најде задоволителен модел, може да се користи и за сумирање на својствата на лекот и за проценка на параметрите на моделот (т.е. дозвола и обем на дистрибуција). Моделот може да се користи и за изведување симулации да се набулдува однесувањето на лековите и плазматските концентрации во ситуации што сè уште не биле испитувани. На пример, концентрациите во плазмата може да се симулираат со употреба на разни видови на администрација на лекови; параметрите добиени од единечни дози може да се користат за симулирање на „steady-state“ состојби по повеќекратни дози на лек, како и кога се користат различни дози и интервали на дозирање за да се утврдат оптимални режими за насочување на посакуваните концентрации во плазмата.

2.1.3. Физиолошки модел на ограничен проток

Овој модел претставува пореална слика за склоноста на лековите кон различни ткива и органи. Бројот на простори вклучени во овој модел зависи од карактеристиките на достапноста на лекот. Сепак, претпоставката дека движењето на лекот е многу побрзо од брзината на дистрибуција во областа на крвна перфузија е применлива само за лекови со изразена стапка на пенетрација во мембраните т.е. со мала молекуларна маса што се јонизираат потешко и се липофилни. Пропустливоста на клеточната мембрана е ограничување на стапката за поголеми и поларни соединенија

Предноста на овој модел е:

- Математичкиот модел е јасен и едноставен.
- Совпаѓање на податоците не е потребно, концентрацијата на лекот во различни области на телото може да се предвиди врз основа на волуменот на органот или ткивото, стапката на перфузија и експериментално утврдениот коефициент на раздвојување на плазма-ткиво.
- Моделот дава точен опис на профилот на концентрација на лек-време, во секој орган или ткиво и со тоа подобра слика за карактеристиките на дистрибуцијата на лекот во телото.

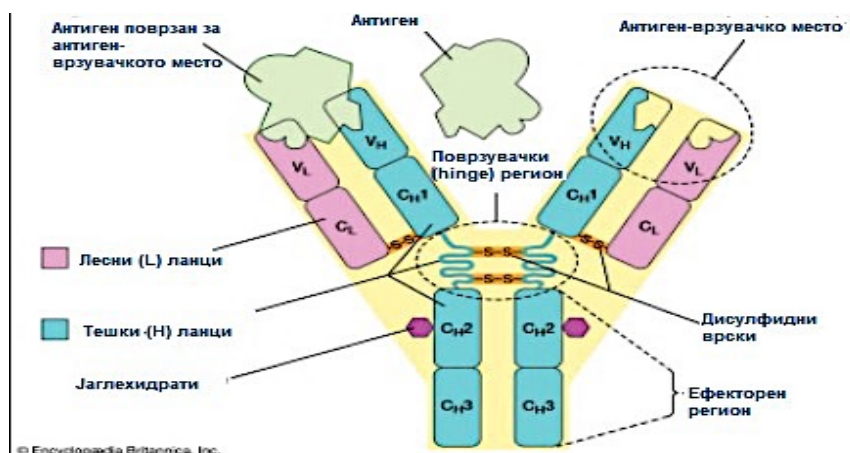
Поврзување на податоци со некои животински видови е можно и некои лекови може да бидат екстраполирани и кај луѓето.

2.2. ФАРМАКОКИНЕТИКА НА КОНЈУГИРАНИТЕ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА

2.2.1. Антитела – структура и функција

Антитела или имуноглобулини (Ig) се гликопротеински молекули кои се создаваат од страна на плазма клетките и настануваат со активација, пролиферација и диференцијација на Б-лимфоцитите како последица на контакт со молекули кои организмот ги препознава како туѓи-антигени. Антителото специфично се врзува со антигенските детерминанти познати како епитопи, додека делот од антителото кој што е одговорен за врзување за епитопот е познат како паратоп. Всушност, специфичното врзување на паратопот за епитопот е основа за примена на антителата во терапевтски цели. (Milcic E, 2016) Постојат пет класи на антитела: IgM, IgE, IgA, IgG и IgD, кои помеѓу себе се разликуваат по уникатната секвенца на аминокиселини во константните подрачја од тешките ланци кои поттикнуваат

специфични структурни и функционални особини. Моноклоналните антитела кои се користат во терапевтски цели главно припаѓаат на класата на имуноглобулини G. Имуноглобулин G е изграден од два лесни (L) и два тешки (H) пептидни ланци, помеѓу себе поврзани со ковалентни, дисулфидни врски и нековалентни врски. Лесните ланци се состојат од еден варијабилен (V_L) и еден константен (C_L) регион, додека кај тешките ланци разликуваме четири региони, еден варијабилен (V_H) и три константни (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) региони. (Kindt T, Goldsby R, Osborne B, 2007) Специфичноста кон антигенот е определена со Fv (анг. Variable fragment) регионот, односно хиперваријабилниот регион кој содржи три комплементарно-дефинирачки региони (Complementary Determining Regions, CDR), од кои најголема варијабилност има CDR_3 и кој најмногу учествува во врзување на антигенот. Антителата своите Fc региони (најчесто е тоа C_{H2} доменот) го користат за активација на различни ефекторни механизми (слика 6).



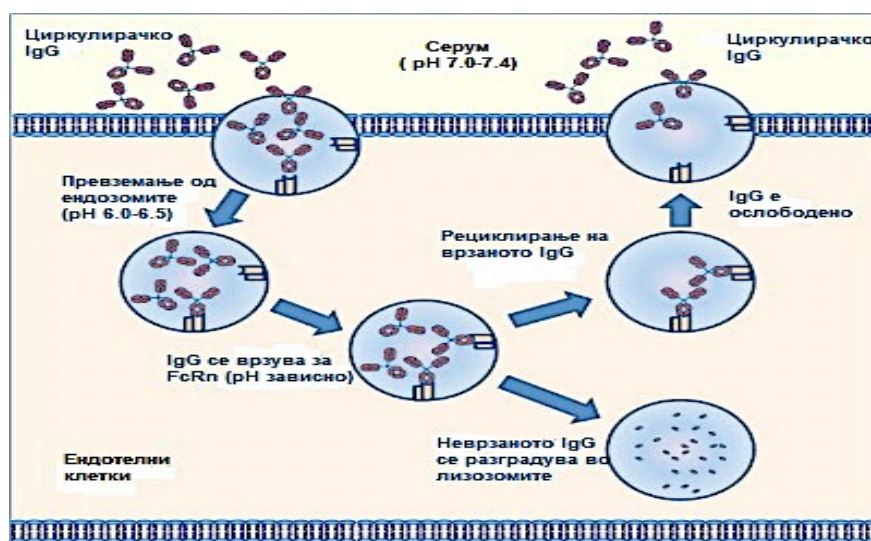
Слика 6. Структура на антитело

Antibody structure

(сликата е превземена и адаптирана од web страната <https://www.britannica.com/science/monoclonal-antibody>)

Антитело-зависна клеточна цитотоксичност (анг. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) и комплемент-зависна цитотоксичност (анг. Complement-dependent cytotoxicity, CDC) се најважните ефекторни механизми. Треба да се напомене дека кај луѓето IgG1 поткласата е најефикасна во активација и на двата ефекторни механизми што ја прават најприкладна за користење во хумана терапија на тумори и инфекции предизвикани од различни патогени. Од друга страна, IgG4 поткласата е најмалку ефикасна, па затоа овие антитела се користат во дијагностички цели или пак кога е неопходно да се блокираат некои молекули на површината на клетката без активирање на ефекторните механизми. Покрај ова,

Fc регионот е поврзан и со временскиот полуживотот на IgG во серумот. Еден тип на FcR познат како неонатален FcR (анг. Neonatal Fc receptor, FcRn) се наоѓа во ендотелните и некои други видови на клетки кај возрасни, при што учествува во заштита на IgG од интрацелуларен катаболизам. Кога ендотелните клетки ќе го превземат антителото, FcRn кој се наоѓа во ендозомите на ендотелните клетки, се врзува за антителото помеѓу CH₂ и CH₃ доменот (слика 7). На овој начин поврзаното антитело е заштитено од деградација од страна на лизозомите со што повторно се враќа во циркулацијата. Како последица на ова IgG имаат полуживот од околу три недели. Оваа особина на Fc регионот кај IgG антителата има големо значење при формулирање на биолошките лекови. (Stojic- Vukanic Z et al, 2012).



Слика 7. Врзување на FcRn рецепторот

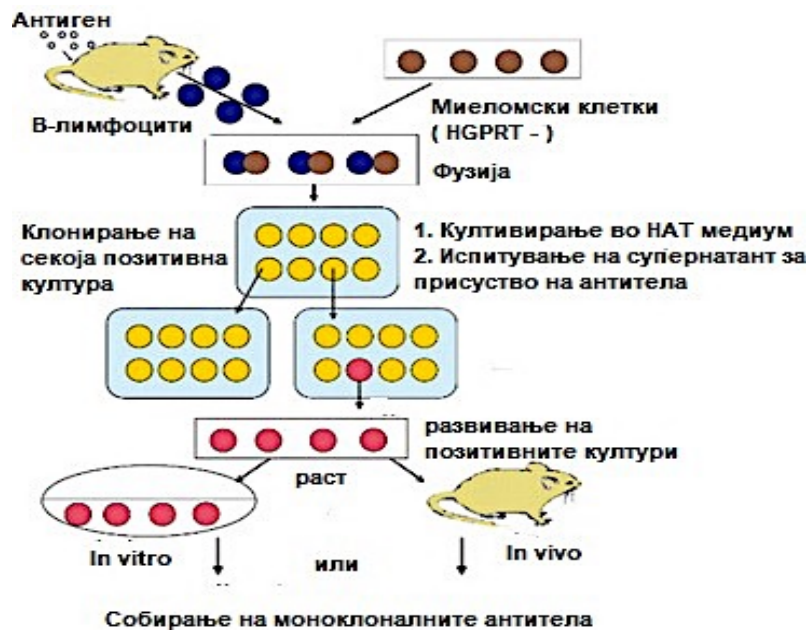
Binding of FcRn receptor

(сликата е превземена и адаптирана од Buss N et al., 2012)

Повеќето антигени имаат повеќе епитопи и затоа поттикнуваат размножување и диференцирање на повеќе Б-клеточни клонови, при што секој клон е изведен од Б-клетката која препознава посебен епитоп. Серумските антитела кои се добиваат при тоа се хетерогени, сочинувајќи мешавина на антитела, при што секое е специфично за еден епитоп, познати како Поликлонални антитела. Поликлоналните антитела се користат веќе неколку децении за индуцирање на пасивна имунизација против заразни болести и други штетни агенси, особено токсини. Моноклоналните антитела, за разлика од Поликлоналните, се добиваат само од еден клон на Б-лимфоцити и се специфични за врзување само со еден антиген. (Kindt T, Goldsby R, Osborne B, 2007)

2.2.2. Моноклонални антитела

Моноклоналните антитела за прв пат биле добиени во 1975 година со развојот на Хибридомната технологија од страна на Келер и Милштајн, кога успешно фузирале бесмртни миеломски клетки со антитело-продуцирачки Б-лимфоцити (Слика 8). Добиените хибридомни клетки претставувале непресушен извор на моноспецифични антитела и дале можност за производство на ваков тип на антитела кон скоро секој вид на антиген. Со ова настанува првата генерација на глувчешки моноклонални антитела која е користена во терапевтски цели.



Слика 8. Производство на моноклонални антитела со хибридомна технологија. На миеломските клетки им недостасува генот за HGPRT (hypoxanthine-guaninephosphoribosyltransferase) и не содржат било какви други имуноглобулин-продуцирачки клетки. Добиените хибридомни клетки се култивираат *in vitro* во селективен HAT (Hypoxanthine-aminopterin-thymidine) медиум каде единствено хибридомните клетки преживуваат (сликата е адаптирана од web страната <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/hybridoma-technology>)

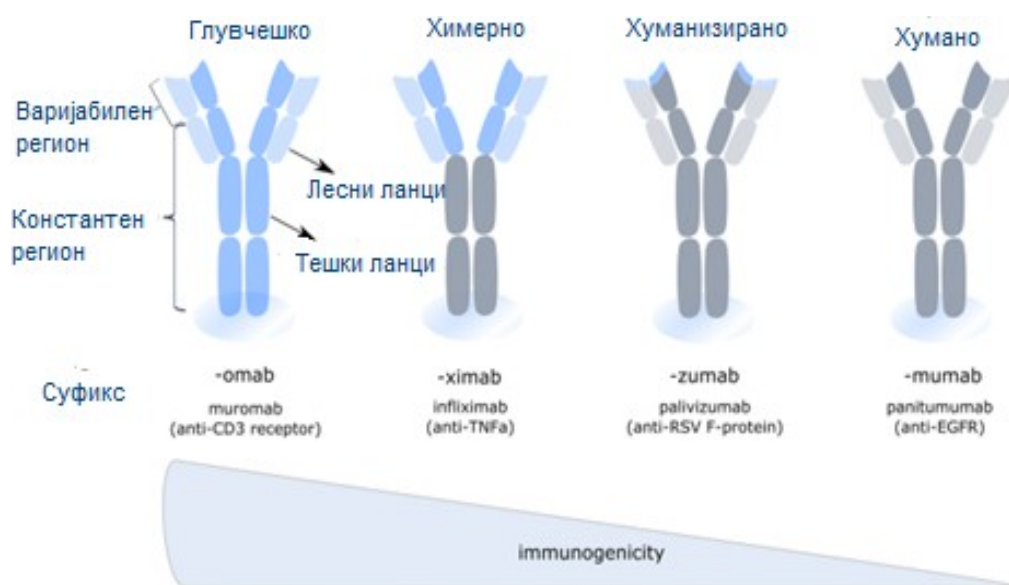
mAB generation by the hybridoma technology. Myeloma cells lack the HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) gene and donot contain any other immunoglobulin-producing cells. There sulting hybridoma cells are cultured *in vitro* inselective HAT (Hypoxanthine-aminopterin-thymidine) medium where only hybridoma cells survive

Првото моноклонално антитело одобрено од страна на US FDA во 1986 година, е анти-CD3 глувчешкото моноклонално антитело, muromonab (Orthoclone OKT3®) (Табела 1) кое е одобрено за спречување на акутно отфрлање на трансплантирани органи. И покрај големите очекувања, терапијата со глувчешки моноклонални антитела не покажала добри резултати. Причината е во тоа што глувчешките моноклонални антитела се имуногени за луѓето и терапијата со овие антитела,

особено при повторна апликација, доведува до тешки имунолошки реакции како резултат на создавање на Хумани анти-глевчешки антитела (анг. Human anti-mouse antibody, HAMA) .(Walsh G, 2003).

2.2.2.1. Химерни моноклонални антитела

Со цел надминување на проблемите поврзани со имуногеноста на глевчешките моноклонални антитела, развојот на рекомбинантната DNA технологија овозможила трансформирање на глевчешкото антитело во структури слични на хуманите антитела, без губење на специфичноста. Химерните антитела се составени од варијабилен глевчешки регион и хуман константен регион (Слика 9). Овие антитела ја имаат истата специфичност како и глевчешкото антитело од кое се добиени, додека полуживотот и ефекторните функции се многу слични со хуманите антитела. Во 1994 година, второто антитело кое е одобрено за терапевтски цели е Abciximab (Reopro®), Fab фрагмент на химерномоноклонално антитело за превенција од тромбоза (Табела 1). Иако химерните моноклонални антитела се помалку имуногени во однос на глевчешките, сепак можат да доведат до создавање на Хумани анти-химерни антитела (анг. human anti-chimeric antibody, HACA).



Слика 9. Преглед на видовите на моноклонални антитела кои се користат во терапија (сликата е превземена и адаптирана од Hoeckle LV, Roose K, 2019)

Overview of monoclonal antibody variants used in therapy

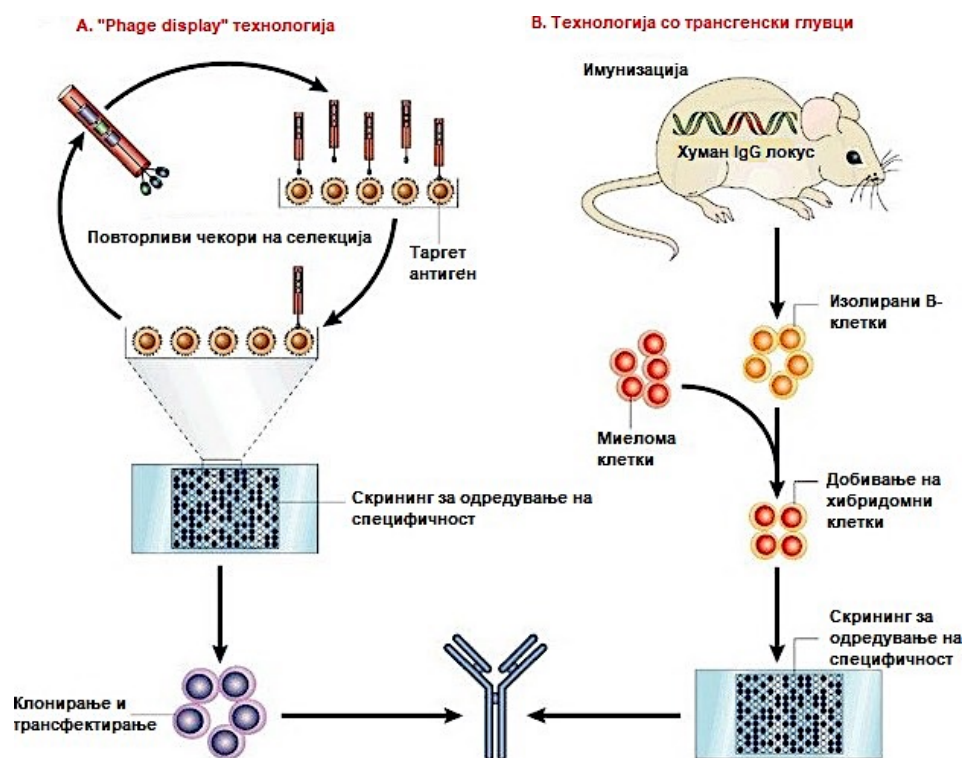
2.2.2.2. Хуманизирани моноклонални антителиа

За дополнително намалување на имуногеноста на химерното моноклонално антителио, била воведена постапка на хуманизирање на антителиата, со која се врши трансфер на нуклеотидните секвенци кодирани за CDR регионите на глувчешкото антителио во хуман ген за антителиото. Меѓутоа, антителиото кое било добиено со оваа постапка имало значајно намален афинитет за врзување на антигенот. За да се надмине овој недостаток, покрај CDR, направен е и трансфер на секвенците од глувчешкото антителио кои ја поддржуваат ориентацијата на CDR во просторот, при што се добива моноклонално антителио кое е 90% хумано. Првото хуманизирано моноклонално антителио кое е одобрено од страна на US FDA во 1997 година е daclizumab (Zenapex®), анти-IL-2 антителио кое се применува за превенција од акутно отфрлање на трансплантирани бубрези.

2.2.2.3. Хумани моноклонални антителиа

Крајната цел во развојот на моноклонални антителиа кои би се употребувале за терапевтски цели е добивање на моноклонални антителиа кои ќе бидат комплетно од хумано потекло при што максимално ќе биде намалена имуногеноста. За разлика од производството на глувчешките моноклонални антителиа кое е веќе рутинско, производството на хумани антителиа со класичната хибридомна технологија е многу помалку успешно и не е едноставно, бидејќи хуманите хибридомни клетки се нестабилни и *in vivo* имунизацијата на луѓето не е возможна за секој вид на антиген. Со развојот на “Phage-display” технологијата е овозможен развојот на хумани моноклонални антителиа. Таа се базира на формирање библиотеки од гени кои ќе кодираат синтеза на антителиа или нивни фрагменти специфични за антигенот од интерес и понатамошна селекција на антителиата кои со најголем афинитет ќе се врзуваат за целната молекула. Првото хумано моноклонално антителио добиено со оваа технологија е adalimumab (Humira®) одобрено во 2002 година од страна на US FDA во третман на Ревматоиден артрит (Табела 1). (Bazan J et al., 2012).

Покрај “phage-display” технологијата за добивање на хумани моноклонални антителиа се користи и технологијата на трансгенски глувци (слика 10), со која се врши генска манипулација, односно инкорпорирање на хумани гени кои го кодираат антителиото од интерес во геномот на глушец. Panitumumab (Vectibix®) е првото хумано моноклонално антителио добиено со помош на оваа технологија кое во 2006 година е одобрено за терапија на колоректален карцином од страна на US



Слика 10 .In vitro и In vivo технологии за добивање на хумани антитела илустрирани преку "Phage display" технологијата и технологијата со Трансгенски глувци (сликата е превземена и адаптирана од Brekke OH, Sandlie I., 2003)

In vitro and in vivo human antibody techniques exemplified by phage display and transgenic mouse technologies

2.2.3. Терапевтска примена на моноклоналните антитела

Моноклоналните антитела поради големиот број на предности, денес се најбрзо растечка група на лекови со значаен терапевтски потенцијал и широка примена. Се користат за најразлични индикации, за третман на различни видови на тумори, автоимуни, кардиоваскуларни и инфективни болести, некои ретки болести, астма како и за in vivo дијагностика, а постојаниот развој во полето на генетскиот инженеринг и откривањето на нови таргети ќе води и до проширување на терапевтските подрачја. Можен е развој на моноклонални антитела за скоро секој антиген, а специфичното врзување на антителата на целниот антиген со висок афинитет е основа за нивната употреба во терапевтски цели. Покрај специфичноста и селективноста кои како резултат даваат релативна сигурност во примената, други предности се и фармакокинетските својства, ефекторските функции и можноста за нивна употреба како "носачи" за имунотерапија и имунодијагностика. Моноклоналните антитела можат да се

користат како слободни- неконјугирани или конјугирани со различни цитотоксични лекови, радионук или токсини со цел подобрување на специфичноста и фармаколошкиот одговор како и намалување на појавата на несакани ефекти.

Сепак, терапијата со антитела не е секогаш ефикасна. Кај некои типови на пациенти, туморите можат да бидат огноотпорни или отпорни на туморските моноклонални антитела (ТМА) или може да се повторат. Постојат низа стратегии за подобрување на ТМА за ваквите типови на пациенти. Приодите вклучуваат, меѓу другите, синтеза на конјугати на антитела-лекови и терапевтски радио-антитела; некои од нив веќе имаат добиено регулаторно одобрување за клиничка апликација (Ујани и Чесон, 2013).

Различни соодветни радиоизотопи кои емитуваат честички се достапни за радиоозначување на ТМА за радиоимунотерапија (РИТ) на тумори. Овие радиоизотопи се разликуваат во однос на нивниот режим на распаѓање, полуживотот, енергијата на честичките и хемијата. Во РИТ на CD20 + NHL, производите што виделе одобрение за клиничка апликација биле радио означени со бета-емитери; Итриум-90 (ibritumomab / 90Y-ibritumomab tiuxetan) („Писмо за одобрување - Ibritumomab Tiuxetan, (Зевалин), IDEC Pharmaceuticals Corp - ucm113489.pdf“, nd) и јод-131 (tositumomab / 131I - Tositumom) (БЛА)> Писмо за одобрување Бексар 6/27/03 “, второ). Другите клинички корисни радиоизотопи вклучуваат Лутетиум-177, Ре-188, Самариум-153, итн. Општо земено, радиоизотопите кои емитуваат бета честички со голем опсег може да бидат покорисни за големи туморски маси, додека емитерите на бета честички со низок опсег може да бидат покорисни за малите туморски маси, вклучувајќи мали метастатски лезии.

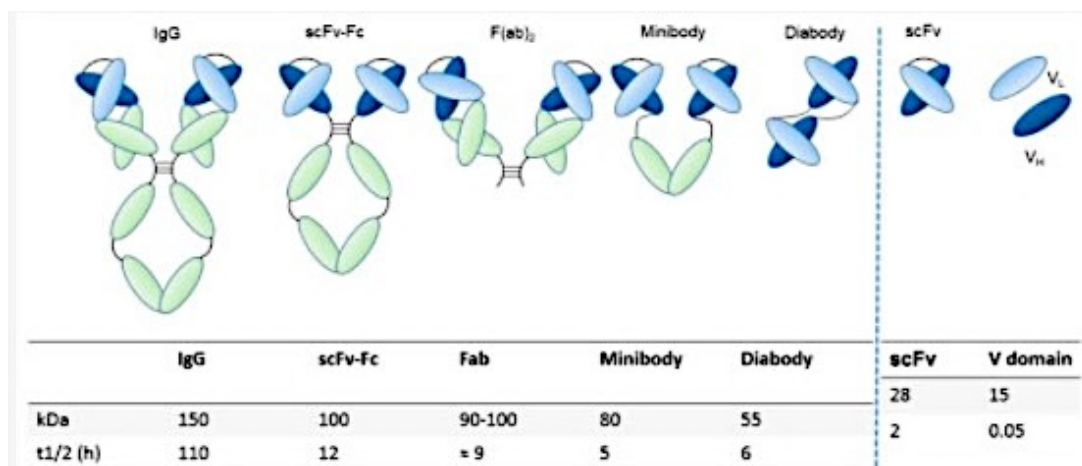
Радиоактивното обележување на ТМА може да се постигне или директно или индиректно (Sugar et al., 2014). Директниот пристап е изводлив за радиоодирање, но тој е несоодветен за повеќето работи со етикетирање на радиометалот, бидејќи ТМА немаат силни хелатни групи за силно да ги врзат радиометалните катјони. За клиничка корисност на радиофармацевтска основа заснована на ТМА, ин виво термодинамичката и кинетичката стабилност на металниот комплекс е од витално значење. Оттука, неопходна е деривација на ТМА за воведување силни групи на хелатори. Веќе се синтетизирани и широко проучувани групи на хелатори кои се потенцијални корисни за различни радиометали (Brechbiel, 2008). За тривалентни радиометални катјони како што се лутетиум или итриум, најчести се дериватите на

ДОТА и дериватите на ДТПА. Како веќе достапен клинички пример, дериватизацијата на ибритумомаб е направена со тиуксетан за радиоозначување со итриум-90 (Jacobs, 2007).

Сите тековно одобрени РИТ радиофармацевтски производи се формулирани како течни препарати. Предизвиците поврзани со ваквите формулации се стабилноста на антителото во складирање и тежок процес на радиоозначување. Стабилноста на антителата во нивните раствори за ниска концентрација е мала, па оттука и нивниот краток рок на траење и строгиот транспорт и складирање со ладен ланец. Незгодната постапка за радио обележување го зголемува ризикот од мешавини и слаб квалитет на инјектираниот препарат. Од таа причина, потребно е да се произведе постабилен препарат полесен за радиоозначување, по можност во процес во еден чекор; има долг рок на траење во складирање и не бара строги услови за ладно ланец за време на дистрибуцијата.

2.2.4. Деривати на антитела

Антителата имаат молекулска маса од околку 150 kDa што ги прави големи молекули кои тешко поминуваат од циркулацијата до целното место (пр. туморска маса) и тешко се елиминираат од организмот. Знаејќи дека антителата со Fab фрагментот го препознаваат антигенот а со Fc регионот ги извршуваат ефекторските функции, производството било усмерено на добивање на деривати на антитела кои содржат само варијабилан регион (Fab, F(ab)₂ и Fv), кои имаат подобар клиренс, подобра пенетрација во клетките/туморските маси и се попогодни за примена во дијагностички цели и во терапија со радиоактивни супстанции (Слика 11). Посебна категорија на деривати се биспецифичните антитела, кои се составени од два Fab фрагменти кои потекнуваат од две антитела со различна специфичност, при што едниот Fab фрагмент се врзува за антигенот на површината на туморската клетка, додека другиот фрагмент се врзува за ефекторска клетка, со што истовремено се врши и нивна активација. Catumaxsomab (Removab®) е првото одобрено биспецифично антитело од страна на US FDA во 2009 година, индицирано за терапија на Малиген асцитис со интраперитонеална примена кај пациенти со EpCAM (анг.epithelial cell adhesion molecule) позитивен карцином. Дејствува така што едниот Fab фрагмент е насочен кон адхезивниот молекул на епителните клетки (EPCAM) а другиот кон CD3 молекулот на Т- лимфоцитите. (Табела 1). (Duranti C, Arcangeli A, 2019).

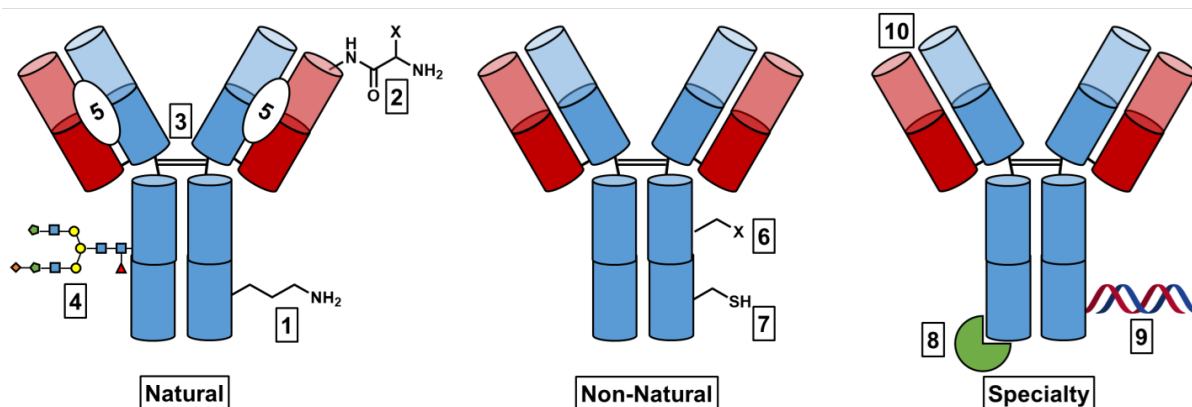


Слика 11. Различни деривати на антитело се претставени на сликата, претставувајќи ја нивната големина во споредба со интактно IgG. Ig-имуноглобулин; scFv- варијабилен фрагмент со еден синџир; V domain-варијабилен домен. На сликата се претставени и големината (kDa) на секој различен дериват и нивниот полуживот. (сликата е превземена и адаптирана од Duranti C , Arcangeli A., 2019)

Different antibody derivatives are reported in the figure, showing their different size compared to intact IgG. Ig, Immunoglobulin; scFv, single-chain variable fragment; V domain, variable domain. In the figure, the size (KDa) of each different antibody derivative and their half-lives are also reported.

2.2.5. Конјугирани моноклонални антитела

Додека способностите на неконјугираните, антитела од прва генерација, се импресивни, постои растечки тренд кон доделување на природното антитело со неприродни способности (имуно-конјугати) за подобрување на терапевтската ефикасност. Ова доаѓа во најчеста форма како третман на рак со употреба на конјугати на антитела-лекови (ADC). Формулациите на ADC поседуваат конјугирани цитотоксични лекови кои имаат подобрени локализирани ефекти преку насочено породување користејќи го антителото за да обезбедат специфичност и цитотоксичен товар како активен агенс. Постојат неколку различни методи (и специфични за локацијата и не-специфични за локацијата) за конјугирање на функционални лиганди со антитела. Опциите за конјугација за модификација на антителата може да се поделат во три примарни категории: природно-настанати места на модификација кои постојат во природната структура на антитела (природно), не-природно-настанати места кои можат да се додадат во 'рбетот на антителата преку генетска манипулација (не-природно) и уникатни модалитети за модификација на антитела (специјалност) кои не спаѓаат уредно во категориите за модификација природни и не-природни (Слика 12).



Слика 12. (1) Природни аминокиселини, (2) Н-терминален тежок и лесен ланец, (3) Интерхранични дисулфидни врски, (4) Делумен на јаглени хидрати, (5) Етикетирање на фото-афинитет на НБС, (6) Не-природни аминокиселини, (7) Инженерски цистеини, (8) Протеински-протеински интеракции, (9) Инженерски ознаки, (10) Каталитичка активност.

(1) Natural amino acids, (2) N-terminus heavy and light chain, (3) Interchain disulfide bonds, (4) Carbohydrate moiety, (5) NBS photoaffinity labeling, (6) Non-natural amino acids, (7) Engineered cysteines, (8) Protein-protein interactions, (9) Engineered tags, (10) Catalytic activity.

Категориите и потенцираните техники детално наведени подолу не се наменети да бидат исцрпен список, а повеќе репрезентативни примери на најчесто користени стратегии за конјугација. (Wang J, 2016; Allen KJ, 2018; Ryman JT, 2017; Brocks DR, 2015). Изборот на оптимална техника на конјугација зависи од голем број фактори, вклучувајќи: да се приложи, предвидената цел, количината на конјугации потребни за да се постигне терапевтска ефикасност, можноста за конјугирање без негативно влијание врз специфичноста на антителата и толеранцијата за хетерогеност низ популацијата на конјугираните антитела. (Zuo P, 2020) Важна мерка за хетерогеност е лекот-разносот на антителата (DAR). Минимизирање на варијабилноста на DAR е важно бидејќи поголема хетерогеност може да резултира со разновидна фармакокинетика, намален полуживот, зголемен клиренс на плазма, зголемена токсичност и ќе ја зголеми тешкотијата да се постигне стабилна клиничка формулација.

Природни конјугирани антитела

Антителата се релативно големи гликопротеински молекули со маса од 150 kDa кои имаат многу природно појавувачки места за конјугација. Постојат хемии за конјугирање на многу од 20 канонски аминокиселини (Zou H, 2020; Chien JY, 2005). И покрај бројните достапни хемиски пристапи, најчестото место за конјугација со

протеините е преку страничниот ланец на ϵ -амин лизин (Kagan L, 2012). Поради големото изобилство на остатоци од лизин (> 80 во рбетниот столб на антитело), неговиот позитивен полнеж, релативно долгото проширување во раствор и лесно достапните техники на водена конјугација, таа останува најкористената техника и покрај тоа што не е специфична за локацијата. (Gabrielsson J. 2014; Ward RMM 2012). Додека високото изобилство на лизин е корисно за постигнување на високи нивоа на конјугација на површината на антителата, контролата над бројот на конјугации по антитело (ДАР) или нивните релативни локации на површината на антителата е ограничена на никаква. (Pandey S, 2010; Falck D, 2021). Од оваа причина не е невообичаено да се има многу хетерогена конјугирана популација на антитела со некои конјугации што се случуваат на Fab, Fc, па дури и на регионот што го одредува комплементарноста на антигенот (CDR) што резултира во делумна инактивација на конјугирана популација на антитела. Измена на оваа техника на амин конјугација се изведува под строги услови што овозможуваат селективна конјугација на Н-крајниот дел на тешките и лесните ланци на антителата, искористувајќи ја различната pK_a вредност на ϵ -амин на лизин наспроти N-термин α -амин (Goldenberg, D.M, 2007). Поради близината на Н-терминалот до регионот за врзување на антигенот, постојат некои прашања поврзани со стеричното мешање со врзувањето на антигенот по конјугацијата (Kagan, L., 2012; Dave, V., 2018).

Друга вообичаена аминокиселина која се појавува природно и може да се искористи за конјугација е страничниот ланец на цистеин. Невообичаено е групата цистеин тиол да е во слободно-редуцирана форма во природата, бидејќи често се открива дека се конјугирани со друг остаток на цистеин преку дисулфидна врска и тоа не се разликува кај антителата. Повеќето антитела имаат четири интерсинзивни дисулфидни врски кои ги соединуваат тешките ланци на антителата во регионот на шарката и тешките и лесни ланци во регионот ФаБ. (Waldmann TA; 1991, Zuo P. 2020), Поради значително намалениот број на реактивни места, во споредба со конјугацијата на лизин, постои соодветна значително намалена хетерогеност забележана во добиениот конјугат на антитела. Дисулфидните врски во регионот на шарката можат селективно да се намалат, обезбедувајќи локациска специфична локација, за конјугирање на тиол-реактивен поврзувач, како што е малеимид, што резултира во формирање на тиестерска врска (Wang J., 2016), која исто така може да се искористи како цели за размена на дисулфидни врски овозможувајќи алтернативна методологија на

конјугација (Goldenberg, D.M., 2007; Figueroa, I., 2018) специфична за страницата со употреба на канонски остатоци од цистеин. (Ait-Oudhia, S., 2017; Singh AP, 2017). Антителата се подложени на пост-преведувачки модификации, вклучително и на гликозилација, кои обезбедуваат дополнително единствено природно место за конјугација (Polli, J.R., 2019). Реактивна алдехидна група може да се создаде на местата на јаглени хидрати преку реакција на оксидација преку додавање на натриум перидат, овозможувајќи понатамошна реакција со хидразидни функционализирани врски. (Malik, P., 2017; Ibrahim, A.B., 2018) Поради несакани реакции поврзани со изложеност на периоди, и разновидна природа и состав на пост-преведувачки модификации на протеини, оваа техника бара значителна оптимизација од антитела во антитела. (Kamath, A.V., 2015; Hedrich, W.D., 2018; Rosenbaum, S.E. ed., 2016) Важно е да се напомене дека ниту јаглехидратите, ниту стратегиите за модификација. Антителата се подложени на пост-преведувачки модификации, вклучително и на гликозилација, кои обезбедуваат дополнително единствено природно место за конјугација (Polli, J.R., 2019). Реактивна алдехидна група може да се создаде на местата на јаглени хидрати преку реакција на оксидација преку додавање на натриум перидат, овозможувајќи понатамошна реакција со хидразидни функционализирани врски. (Malik, P., 2017, Ibrahim, A.B., 2018) Поради несакани реакции поврзани со изложеност на периоди, и разновидна природа и состав на пост-преведувачки модификации на протеини, оваа техника бара значителна оптимизација од антитела во антитела. (Kamath, A.V., 2015; Hedrich, W.D., 2018; Rosenbaum, S.E. ed., 2016) Важно е да се напомене дека ниту јаглехидратите, ниту стратегиите за модификација на тешки и лесни ланци на јаглени хидрати -фазни формулации на ADC.

Неодамна беше опишана алтернативна стратегија за конјугација со користење на високо зачувано место за врзување присутно во скоро сите изотипови на антитела и низ видовите помеѓу тешките и лесните ланци во променливиот регион на антителата познато како Нуклеотидна врска (NBS, Allen, K.J., 2018). Оваа стратегија за конјугација предвидува две места на конјугација, позајмување на симетријата на природните антитела и се постигнува преку УВ активирање на NBS насочена кон мала молекула како што е индол (Sager, J.E., 2015; Zhao, J., 2015). Иако оваа стратегија за конјугација е привлечна, таа сè уште не е потврдена во студии на животни и ема податоци за клинички студии (Sager, J.E., 2015; Lautz, L.S., 2019).

Природни конјугирани антитела

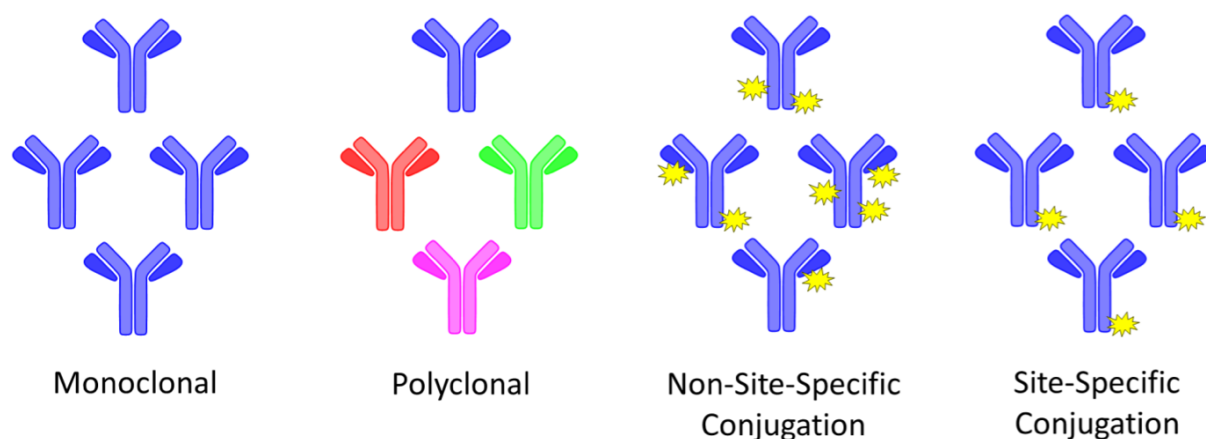
Постојат две примарни техники за модификација на не-природни антитела кои бараат употреба на генетски инженеринг за да се вметне не-природна аминокиселина (Sterjova, M., 2019) или да се постави инженерски остаток на цистеин (Ovacik, M., 2018) во 'рбетот на антителата за последователна конјугација. Со додавање на не-мајчински цистеин, меѓусинциските дисулфидни врски кои ја одржуваат терцијарната структура на антителата можат да останат недопрени, додека сепак овозможуваат употреба на високоразвиените хемиски реакции и линкери специфични за тиол (Lin, K., 2012). Популација на антитела, но е потребен најинтензивен развој однапред. Додавањето на неканонски аминокиселини исто така е истражено за да се искористат алтернативните, ортогонални, хемиски стратегии за лигатура за да се подобри хомогеноста на конјугацијата. (Sterjova, M., 2019; Wang, J., 2016) модификација на антитела што не се појавува природно, секое антитело треба да биде специфично изразено со модификација на 'рбетот, правејќи ја оваа техника помалку пожелна бидејќи антителата надвор од полицата не можат лесно да се модифицираат. Местата за модификација на 'рбетот мора внимателно да се тестираат за да се осигури дека добиеното конјугирано антитело ги одржува неговите други пожелни инженерски карактеристики како што се продолжениот серумски полуживот и можностите за имунолошка активирање, секогаш кога се релевантни за секоја единствена апликација.

Другите стратегии за модификација на антитела вклучуваат протеински-протеински интеракции (Benedetto, R., 2017), инженерски ознаки (Hu, S., 2020) и антитела кои поседуваат каталитичка активност (Mwanza Wanjeh, D., 2020). Најчестиот пример за интеракција на протеин-протеин (Benedetto, R., 2017) е употребата на специфичен Fc протеин за врзување на антитело како што е ZZ-доменот кој е направен од IgG-врзувачкиот домен на стафилококниот протеин А (СПА). Сите други примери во оваа листа на техники за модификација на антитела резултираат во ковалентна врска помеѓу антителото и функционален поврзувач, освен оваа категорија на интеракција протеин-протеин. Инженерните ознаки (Hu, S., 2020) вклучуваат: сортаза, сплит-протеини, намотки-намотки, шпионски ознаки / шпионски фаќачи или други афинитетни ознаки во кои примарното антитело се модифицира со конструирана ознака што е комплементарна со секундарна ознака или протеин што при асоцијација или ензимска реакција, на антителото му е

дадена природна способност. Антителата кои имаат каталитичка активност се единствени по тоа што нивната антигенска специфичност исто така се смета за нивна подлога. (Uhl, P., 2015; Dammes, N., 2020; Polakis, P., 2016) Во некои случаи, антитела може да биде би-специфична по тоа што едниот Fab може да поседува каталитичка активност, додека другиот има различна антигенска цел или обете ЦДР-региони можат да имаат каталитичка активност. Антителата со каталитичка активност се ретки, а де новиот развој на каталитички домени на терминалот на антителата е нетривијален, што ја прави оваа категорија на специјалитети релативно невообичаена.

Предизвици во формулацијата на конјугираните антитела

Единствени предизвици постојат при формулирање на ADC во споредба со нативни mAb. Како што е детално опишано претходно, комплексноста на примерокот игра голема улога во правењето на формулацијата на специфичен ADC и е исклучително тешко поради различната низа на видови по конјугацијата. Покрај тоа, лековите кои се прикачени на ADC и линкерот со кој е прикачен лекот вметнуваат дополнителна комплексност во формулацијата на ADC. (Singh AP, 2017; Sterjova, M., 2019) Лековите поврзани со ADC честопати имаат помалку од посакуваните карактеристики за растворливост во вода. Овие лекови имаат склоност да предизвикаат агрегација меѓу антителата преку изложување на заштитените региони склони кон агрегација во 'рбетниот столб за време на постапката на конјугација или преку интеракции со лекови-лекови. Ова во голема мера ја ограничува надолжната стабилност, како и можноста за добивање на формулација во висока концентрација. Лековите што се конјугираат за да формираат ADC, исто така, не се исти од ADC до ADC, со што се отежнува утврдување на протоколи за генерализирање на формулацијата. Средствата со кои лековите се прикачуваат на антителото е исто така пречка на која треба да се посвети посебно внимание при формулирање на ADC во споредба со нативното антитело. Линкерите се разликуваат во хемискиот состав, обезбедувајќи му ADC различни способности. Постоечките ланци во антителото овозможуваат нивно расцепување или преку ензимско варење или изложеност на екстремни pH вредности. Овие карактеристики го прават и лекот и линкерот подложни на предвремена деградација и расцепување за време на складирањето, што значително ги ограничува потенцијалните формулациони композиции во споредба на оние кои содржат нативни антитела.



Слика 13: Тешкотијата во формулацијата ја зголемува споредбата на моноклонални антитела со поликлонални антитела и конјугати на антитела-лекови (ADCs) со користење на не-специфични за локацијата и специфични за локацијата стратегии за конјугација.

Formulation difficulty increases comparing monoclonal antibodies to polyclonal antibodies and antibody-drug conjugates (ADCs) utilizing non-site-specific and site-specific conjugation strategies.

Во зависност од избраниот линкер и методот на конјугација на поврзувачот со антителото, критичните карактеристики на антителата кои директно влијаат на растворливоста, вклучително и површинскиот полнеж и зета-потенцијалот, можат да имаат негативно влијание. Од овие причини, лекот, составот на линкерот и целта на антителата се критични компоненти за решавање на специфичните барања на таргетираната терапевтска апликација и причина во исто време за сите проблеми кои се јавуваат при дефинирање на крајната формулација.

2.2.6. Фармакокинетика и фармакодинамика на моноклонални антитела

Во моментот, повеќе од 350 моноклонални антитела (mAbs) и деривати на моноклонални антитела се во фаза на развој како потенцијални терапевтици. Предвидување на фармакокинетика (PK)/ фармакодинамика (PD) на моноклоналните антитела игра клучна улога при нивната примена во клинички студии кај пациенти. Постојат многу потенцијални фармакокинетички причини за варијабилна стапка на одговор на антителата, вклучувајќи појава на токсични ефекти кои ја намалуваат ефикасноста, намалена или слаба апсорпција / дистрибуција / метаболизам / екскреција (ADME) на антителото или ослободен одговор.

Специфичната локација за испорака на терапевтските ефект е крајната цел на фармацевтската индустрија, а се со цел да се зголеми дејството на лековите и да се минимизират несаканите и неспецифичните ефекти. Таргетираната терапија

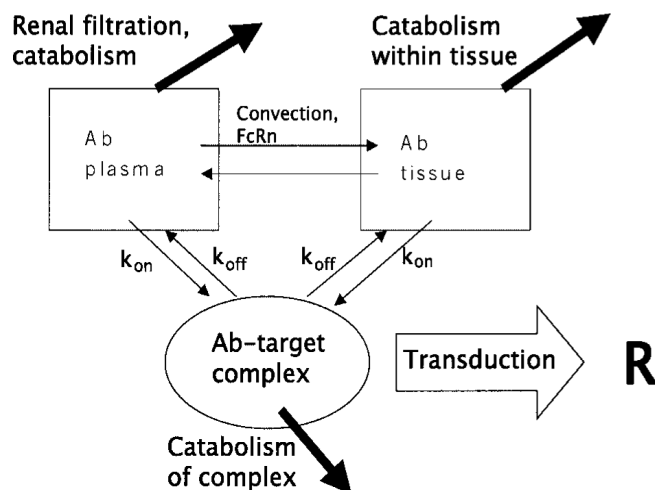
станува сè поважна компонента во третманот на малигни болести.

Традиционално, плазматската фармакокинетиката на лековите кои се мали молекули се користи за да се заклучи нивната ткивна фармакокинетика и да се интерпретираат нивните фармакодинамички или токсикодинамички ефекти. Меѓутоа, за разлика од малите молекули, за многу mAbs плазматската концентрација може да не ја рефлектира точно концентрацијата на местото на дејство (на пример, тумор), што е неопходен пристап за моделирање, способен за прецизно карактеризирање и предвидување не само на плазматската, туку и на ткивната концентрација.

Дополнително, mAbs честопати покажуваат комплексна нелинеарна фармакокинетика во плазмата (на пример, насочено дејство). Поради ова, тешко е користењето на конвенционални алометриски методи и одделни модели од мамиларен тип како неопходен пристап кон моделирање и прецизно зголемување на распространетоста на mAb и во претклинички и во клинички испитувања.

Лековите базирани на моноклонални антитела, се сметаат за разновидна група на терапевтски протеини и се поврзани со неколку интересни фармакокинетски карактеристики. Заситеното врзување со целниот антиген може да влијае на распоредот на антителата, потенцијално доведувајќи до нелинеарна дистрибуција и елиминација. Независно од антигенската интеракција, може да се очекува елиминација зависна од концентрацијата за IgG антитела, како резултат на влијанието на рецепторот, FcRn, кој го штити IgG од катаболизам.

Администрацијата на антителата може да предизвика развој на одговор на ендогени антитела, што може да ја смени фармакокинетиката на терапевтското антитело. Дополнително, фармакодинамиката на антителата е исто така комплексна. Овие лекови може да се користат за широк спектар на терапевтски апликации, а ефектите може да се постигнат со различни механизми.



Слика 14. Генерална шема на фармакокинетика и фармакодинамика на антитела. За многу лекови кои содржат антитела, примарни детерминанти на диспозиција може да се очекува да вклучуваат стапки на конвективно движење на антитела во ткиво, конвективно враќање на антителата во крвта преку лимфната циркулација, транспорт со посредство на FcRn, интеракција со целните супстанции и катаболизам. Интеракцијата со целните супстанции често може да се карактеризира со стапка на асоцијација од втор ред и константна стапка од прв ред на комплексна дисоцијација (k_{off}). Врската на временскиот тек на антитела - формирање на целен комплекс со временскиот тек на ефектите на антителата (R) може да се утврди со кинетиката поврзана со релевантни процеси на трансдукција (на пр., Фагоцитоза со посредство на Fc γ -рецептори, цитотоксичност на клетките зависни од антитела итн.) (Evelyn d. Lobo, Journal of pharmaceutical sciences, vol. 93.11, 2004)

General scheme of antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. For many antibody drugs, primary determinants of disposition may be expected to include the rates of convective movement of antibody into tissue, convective return of antibody to blood via the lymphatic circulation, transport mediated by FcRn, interaction with target substances, and catabolism. Interaction with target substances may be often characterized with a second-order rate constant of association (k_{on}) and a first-order rate constant of complex dissociation (k_{off}). The relationship of the time-course of antibody– target complex formation to the time-course of antibody effects (R) may be determined by the kinetics associated with relevant transduction processes (e.g., Fc γ -receptor- mediated phagocytosis, antibody-dependent cell cytotoxicity, etc.).

Апсорпција на моноклонални антитела

Моноклоналните антитела се администрираат парентерално поради нивната ограничена стабилност на гастроинтестиналниот тракт, слабата липофилност и големата молекуларна големина. Интравенската администрација е најчестиот начин на администрација, што овозможува непосредно системско доставување на голем волумен на лекот и обезбедува целосна системска достапност. Исто така, се користи поткожна или интрамускулна администрација.

Апсорпцијата по поткожна или интрамускулна инјекција е олеснета од лимфниот

систем со биорасположивост генерално во опсег од 50% - 80%.

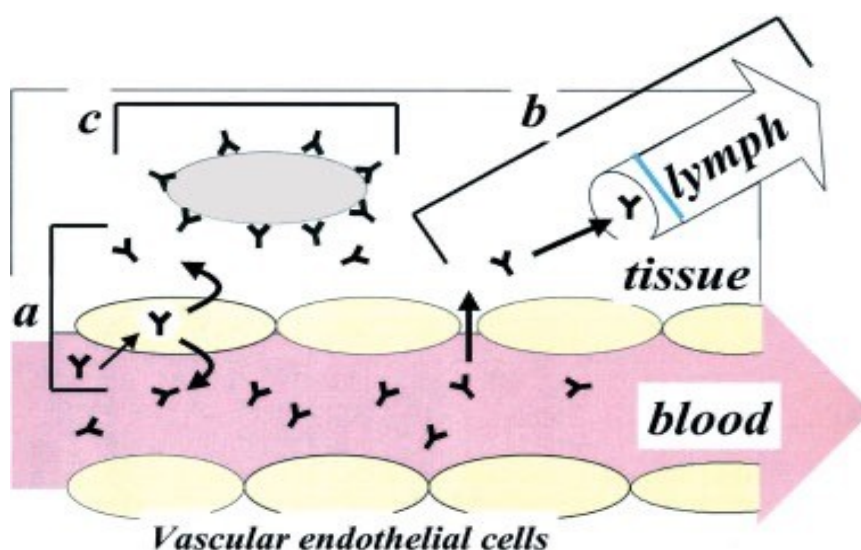
Нецелосната биорасположивост најмногу се должи на протеолитичката деградација на mAbs во интерстицијалната течност или во лимфниот систем [Thompson, G.A., 2013]. Стапката на апсорпција е бавна и обично трае неколку дена за да се достигне врвната серумска концентрација по поткожната или интрамускулната администрација.

Дистрибуција на моноклонални антитела

Дистрибуцијата на антителата содржи различни физиолошки процеси и има посебна сложеност во споредба со малите молекули. Вклучува повеќе процеси како конвекција, дифузија, ендоцитоза и трансцитоза [Thompson, G.A., 2013]. Конвекцијата се смета за примарен механизам за движење на антитела од васкулатурата до интерстицијалните простори. Други потенцијални фактори кои влијаат на распределбата на антителата се врската, кинетиката на комплексот антиген-антитела и нивото на експресија на рецепторот (т.е. антигенски дел) за врзување за специфичноста [Thompson, G.A., 2013].

Општо, обемот на дистрибуција во централниот оддел (V_c) и обемот на дистрибуција во стабилна состојба (V_{ss}) кај луѓето се во опсег од 2-3 L и 3,5-7 L.

Ова е во согласност со постоечките човечки физиолошки параметри и се смета дека mAbs во голема мера се поврзани со васкуларните и интерстицијалните простори [Van Der Graaf, P.H., 2009].



Слика 15. Дистрибуција на антитела. Сликата претставува неколку можни детерминанти на дистрибуција на антитела во ткивото, вклучително: (а) влегување на антитела во васкуларни ендотелијални клетки преку пиноцитоза (на пр., Ендоцитоза во течна фаза) и враќање со посредство на FcRn во крвта или транспорт до ткивниот интерстициум; (б) влез на антитела во ткивниот

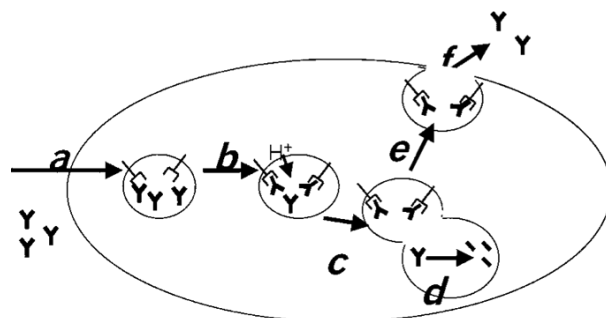
интерстициум преку конвективен транспорт преку парацелуларни пори во васкуларниот ендотел и елиминација на антитела од ткиво преку конвективен транспорт со лимфна течност; и (в) врзување на антитела со клеточни антигени. Како што споменавме во текстот, поради разлики во ефектот на просејување на парацелуларните и лимфните пори, разумно е да се очекуваат ниски концентрации на антитела во интерстицијална течност во однос на крвта. Сепак, антителата можат да бидат поврзани со големи очигледни количини на дистрибуција во случаи кога има високо афинитет / врзување со голем капацитет на антитела во ткивото.

Antibody distribution. The Figure represents several possible determinants of antibody distribution in tissue, including: (a) antibody entry into vascular endothelial cells via pinocytosis (e.g., fluid- phase endocytosis), and FcRn-mediated return to the blood or transport to the tissue interstitium; (b) entry of antibody into the tissue interstitium via convective transport through paracellular pores in the vascular endothelium, and elimination of antibody from tissue via convective transport with lymph fluid; and (c) binding of antibody to cellular antigens. As mentioned in the text, due to differences in the sieving effect of paracellular and lymphatic pores, it is reasonable to expect low antibody concentrations in interstitial fluid relative to blood. However, antibodies may be associated with large apparent volumes of distribution in cases where there is high affinity/high capacity binding of antibody in tissue.

Клиренс на моноклонални антитела

Моноклоналните антитела не подлежат на бубрежна елиминација / екскреција или цитохром P450 (CYP450) – со посредство на хепаталниот метаболизам поради нивната голема молекуларна маса и недостаток на пристап до интрацелуларни ензими како што е CYP450. Антителата се елиминираат примарно со протеолитички катаболизам и се распаѓаат во фрагменти од пептиди и аминокиселини кои можат да се рециклираат во процесот на снабдување со енергија или за синтеза на нови протеини. Терапевтските mAb честопати покажуваат две различни катаболни патеки: (1) неспецифична, со линеарна патека за клиренс, посредувана од интеракција на Fc регионот на mAb со Fc рецептори (т.е. FcRn и Fc рецептори); (2) специфична, нелинеарна (целно посредувана) патека за клиренс, посредувана од специфичната интеракција на ЦДР во регионот Fab со mAb со неговата фармаколошка цел [Van Der Graaf, P.H., 2009; Ovacik, M., 2018; Wang, J., 2016]. Неспецифичната патека за клиренс е независна од специфичните интеракции помеѓу mAb и неговата фармаколошка цел и е честа патека и за ендогените IgG и за терапевтските IgG mAbs. Овој пат има голем капацитет и клиренсот е генерално низок и постојан низ опсегот на терапевтски дози. Се верува дека нискиот клиренс на mAbs е резултат на заштитниот механизам на рецепторот FcRn [Ovacik, M., 2018; Wang, J., 2016]. FcRn е хетеродимер кој содржи лесен ланец на 2-микроглобулин (2m) и тежок ланец од главниот комплекс на хистокомпатибилност (MHC) како класа I и секаде

се изразува во клетките и ткивата [Ryman J.T., 2017] Следејќи го клеточното навлегување на IgG, тој се врзува за FcRn каде што врзаниот IgG се пренасочува кон површината на клетката и потоа се испушта во екстрацелуларната течност, додека неврзаниот IgG се доставува до лизозомот за деградација. Концентрациите на IgG, во терапевтски дози, mAbs е помалку веројатно да се заситат.



Слика 16. Предложен механизам за заштита на IgG од страна на FcRn. (а) молекулите на IgG влегуваат во клетките (на пр. васкуларни ендотелијални клетки, мускулни клетки и сл.) преку пиноцитоза (на пр., ендоцитоза во течна фаза); (б) H^+ влегува во ендо-некои, намалувајќи ја pH вредноста, а IgG се врзува со FcRn; (в) ендозомот се спојува со лизозомот, но IgG поврзан со FcRn не се ослободува во лизозомот; (г) неврзаниот IgG се ослободува во лизозомот и се катаболизира од протеазите; (д) ендозомските осигурувачи со плазматската мембрана, комплексот FcRn - IgG е изложен на физиолошка pH вредност; и (ф) IgG се ослободува во плазмата (или интерстицијална течност).

Proposed mechanism for IgG protection by FcRn. (a) IgG molecules enter cells (e.g., vascular endothelial cells, muscle cells, etc.) via pinocytosis (e.g., fluid-phase endocytosis); (b) H^+ enters the endosome, reducing pH, and IgG binds with FcRn; (c) the endosome fuses with the lysosome, but FcRn-bound IgG is not released to the lysosome; (d) unbound IgG is released to the lysosome and catabolized by proteases; (e) the endosome fuses with the plasma membrane, the FcRn – IgG complex is exposed to physiologic pH; and (f) IgG is released into plasma (or interstitial fluid).

FcRn рецептори и промена на неспецифичниот клиренс

За специфичниата клиренс патека, позната и како целна патека за клиренс, врзувањето на mAb со неговиот целен антиген (типично рецептор поврзан со клетки) може да резултира во интернализација и последователна интрацелуларна деградација на mAb во лизозомите. Бидејќи бројот на рецептори во рамките на дистрибутивниот простор на mAb е ограничен, тие можат да станат заситени во терапевтски дози на mAb. Така, нелинеарниот клиренс може да се добие со побрз вкупен клиренс (т.е. линеарен плус нелинеарен) клиренс при ниски дози и побавен вкупен клиренс при високи дози. Нелинеарните механизми за клиренс можат да бидат временски променливи ако густината на рецепторот

или оптоварувањето на туморот се променат со активност на mAb (на пр. Осиромашување на ЦД20 + Б- клетки со третман со ритуксимаб) [Figueoa, I., 2018]. Врзувањето на моноклоналното антитело со растворлив лиганд исто така може да доживее клиренс со посредство на целта, особено при ниски дози на терапевтски mAb или во случаи на високо ниво на лиганд. Покрај густината на рецепторот, афинитетот за врзување на mAbs кон целната и стапката на обрт на целта може да влијае на клиренсот чија цел е посредство. Во принцип, mAbs со висок афинитет се чини дека покажуваат побрза јасност. Покрај специфичните и неспецифичните патеки за расчистување, неколку други фактори се важни во одредувањето на диспозицијата на mAb. Овие вклучуваат имуногеност на антитела, степен и природа на гликозилација на антитела, ефекторна функција, чувствителност на антитела кон протеолиза и потенцијална интеракција на лекови-лекови помеѓу mAbs и лекови од мала молекула [Wang, J., 2016].

2.2.7. Физиолошки заснован фармакокинетички модел (PBPK)

Моделот PBPK се состои од анатомски и физиолошки значајни простори, компартмани поврзани преку најчесто циркулирачката крв и лимфниот систем. Тие ги интегрираат физиолошките параметри и *in vitro* и *in vivo* ADME податоците и претставуваат квантитативна рамка за механички трансфер. PBPK пристапот претставува почетна точка за проценка на влијанието на својствата зависни од лековите и својствата зависни од системот врз кој делуваат, како и хуманата PK на mAbs. Во 1986 година, Ковел и сор. го објавија првиот PBPK модел за неспецифичен IgG и неговите фрагменти [Covell DG., 1986]. Неколку години подоцна, Бакстер и сор. [Baxter LT., 1986] го прошири PBPK моделот и на специфични и на неспецифични антитела и воведо „формализам со две пори“ за транскапиларна размена на mAb. Во следната студија, моделот беше префрлен од глушец на човек и успешно го предвиде човечкиот PK профит на анти-карциноембрионски антиген антитело. На ваков начин се потврди претпоставката дека за истата структура на модел и воведување на човечки специфични параметри. Човечките физиолошки параметри, како што се крвта и лимфата се добиени или од литературата или со алометриско скалирање фиксен експонент од 0,7. Се претпоставува дека концентрацијата на антигенот и афинитетот за врзување на антителата кон антигенот во човечкиот модел се исти како оние во моделот на глущице. Давда и сор. [Davda JP., 2008] развија PBPK

модел за да ги опишат придобивките на РК на mAb CC49 IgG од панкарцином во нормални и неопластични ткива на “nude” глвци. Моделот е користен за да се докаже диспозицијата на мултивалентните конструкции со еден Fv (scFv) ланец кај глвци, како и да се карактеризира интеракција FcRn – IgG предложена од претходни истражувања. Симулираната изложеност на антитела CC49 во крвта и туморот на пациентот била во согласност со клиничкото набљудување, кое ја поддржуваше клиничката корисност на пристапот PBPK. Singh и Shah [Singh, AP., 2017] воспоставија сеопфатна платформа PBPK со 15 оддели на ткиво и подетален опис на интеракциите на IgG – mAb. Вреди да се напомене дека нивниот модел се засноваше на различни mAbs и обемни податоци за ПК од четири видови (глушец, стаорец, монитор и човек). Структурата и равенките на моделот останаа исти за сите видови и повеќето зависни од системот својства беа како вредностите на литературата. Разумната прецизност на параметрите на моделот се однесуваше на вообичаените проблеми во врска со прекумерната параметрија и идентификацијата на моделот, со што значително се подобрува доверливоста на оваа платформа. Модел платформата развиена од Singh и Shah може да се користи за симулирање на РК-профилите на различни mAb со интеграција на зависни од лекови (т.е. константи на асоцијација и стапка на дисоцијација помеѓу антитела и антиген), обезбедени од корисникот и соодветно зависно од системот. врски (т.е. концентрација на FcRn во ендозомскиот простор и стапка на пиноцитоза и егзоцитоза по единица ендозомален простор на васкуларен ендотелиум) проценета од литературните податоци. Како што се развивало разбирањето за интеракција со IgG – FcRn, почнувала да се цени неговата комплексност во контекст на биолошкиот систем, вклучувајќи го и афинитетот за врзување зависен од pH и ендозомната трговија со временска зависност. Вградувањето на овие карактеристики во моделите PBPK се очекува да ја зајакне нивната механистичка природа и да го подобри предвидувањето на моделот кој се користи.

Платформата на PBPK може да се категоризира во генерички и специјализиран софтвер. За генерички софтвер се бара корисникот да има експертиза за градење математички сложени модели. Покрај тоа, корисниците треба да соберат доволно и точни информации за својствата зависни од системот. Потребно е рутинско одржување за да се обезбедат доследни и квалитетни испораки до тимовите за откривање и развој на лекови за донесување одлуки. Од друга страна, специјализираниот софтвер генерално има потврдена рамка PBPK со претходни

физички-логички параметри и лесен за влез интерфејс за корисни својства зависни од лекови. Како такви, истражувачите во индустријата имаат тенденција да избираат специјализиран софтвер за секојдневна употреба, како и за регулаторни поднесоци, иако сè уште има некои загрижености за претходно спакуваните модели на PBPK, како што се намалена „изложеност“ и нецелосна транспарентност во однос на методите за моделирање се очекува подобрените карактеристики на големи молекули што се користат во специјализиран софтвер да ја промовираат употребата на пристапот PBPK за проекција на mAb PK при откривање и развој на лекови.

Модел на целно посредувана диспозиција на лек - Target mediated drug disposition (TMDD) model

Во 1994 година, Леви го вовеле концептот на TMDD како резултат на некои посебни случаи во кои значителен дел од лекот е врзан за својата фармаколошка цел со голем афинитет, при што оваа интеракција влијаеше на дистрибуцијата и елиминацијата на лек [Levy, 2008]. Иако првично беше идентификуван кај лекови со мала молекула, како што се инхибитори на ангиотензија-конвертирачки ензими, TMDD карактеристики се забележани за многу mAbs [Lin, K., 2012; Jones, H.M., 2013; EMA, 2018;].

Поради комплексноста на PD, секоја екстраполација кај луѓето бара потемелни размислувања отколку за PK. Малку е познато за алометриските односи во параметрите на PD. Се очекува дека постојаните стапки на физиолошки обрт на повеќето општи структури и функции треба да бидат предвидливи за видовите кои се покоруваат на алометриските принципи, додека параметрите за капацитет и чувствителност имаат тенденција да бидат слични.

Преку интеграција на моделирањето на PK/PD и мерењето на видовите, може да се предвидат ефекти на PD кај луѓето ако се претпостави дека односот PK/PD е сличен помеѓу животинските модели и луѓето [Singh, A.P., 2017; Morgan, P., 2001]. На пример, PK/PD моделот беше прв развиен за да се оптимизира режимот на дозирање на mAb против EGF / r3 со употреба на глупци “nude” со тумор како најстар модел на хумано заболување. Овој PK/PD модел последователно беше интегриран со алометарско скалирање за да се пресмета распоредот на дозирање е потребен во потенцијално клиничко испитување за да се постигне специфичен ефект. Сличен пристап е применет и на другите mAbs [Zou, H., 2020; Allen, K.J., 2018; Sterjova, M., 2019], при што PD-параметрите, како што се афинитет на

врзување (kon и cof), стапка на интернализација на комплекс на лекот-цел ($kint$), стапка на деградација на целта константна ($kdeg$) и целното изобилство ($R0$), или експериментално утврдени или добиени од литературата, беа директно интегрирани во моделирањето и предвидувањето. Лу и сор. во 2012 година разви ТМДД модел за анти-АЛК1 (активин рецептор - како киназа 1) антитело PF-03446962 со користење на едно-клучни податоци и успешно го скалираше до човечки [Sterjova, M.,2019]. Прво, беше развиена верзија на мајмун на моделот TMDD со тоа што го постави на податоци за мајмун PK. Параметрите на мајмун TMDD kon , cof , $kint$ и $kdeg$ се добиени или преку експерименти или од литературни податоци.

Овие параметри беа фиксирани при поставување на моделот. Проценета е слободната концентрација на рецепторот пред третманот со лекови (R_0) во параметрите на мајмуните и PK (kel , k_{12} , k_{21}). Второ, истата структура на моделот TMDD беше искористена за симулација на човекот со замена на параметрите на мајмуните со човечки вредности. Експериментално беа утврдени параметрите за човечки TMDD kon , $koff$ и $kint$. Човечкиот $kdeg$ е добиен од литературни податоци со претпоставка дека човечкиот P_0 е ист со оној од мајмунот. Параметрите на човечки PK kel , k_{12} , k_{21} беа намалени од соодветните параметри на мајмун со употреба на алометриско скалирање со експонент од 0,75. Се претпоставува дека човечкиот V_c е волуменот на плазмата. Предвидените човечки AUC и C_{max} на сите пет нивоа на дозирање беа во два пати поголеми од набудувањата.

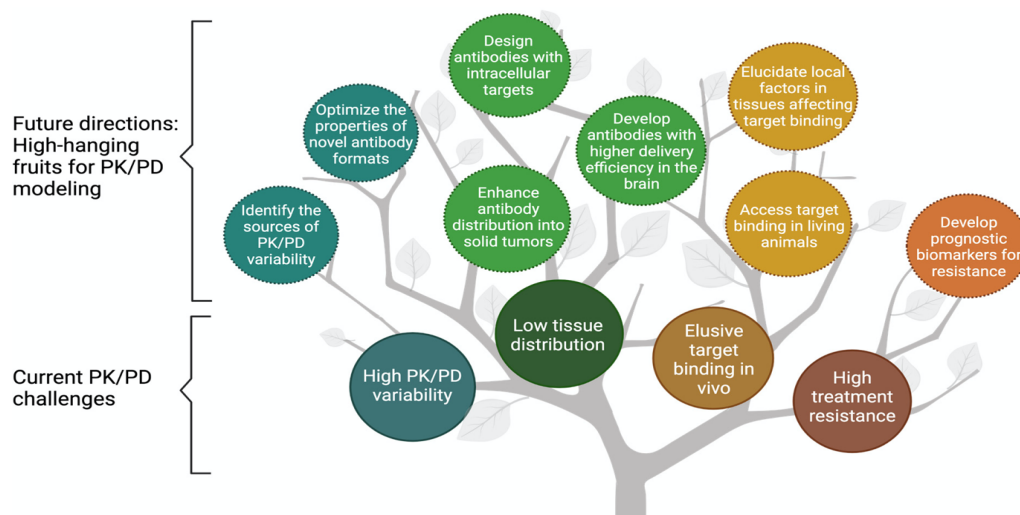
2.2.8. Други размислувања за предвидување на фармакокинетиката на моноклоналните антитела

Предвидување на биорасположивост

Патот на поткожна администрација е привлечен за развој на нови лекови поради неговата погодност. Сепак, досега не постои дефинитивен метод за предвидување на биорасположивост на mAb кај луѓето по поткожна администрација. Способноста за био-расположивост зависи од степенот на апсорпција и пресистемскиот катаболизам и веројатно е да биде под влијание на повеќе фактори како што се афинитетот за врзување $FcRn$ зависен од pH, местото на инјектирање и разликите помеѓу видовите во структурата на кожата [El-Masri, H.A.,1996;]. Понатамошните истражувања на овие фактори би помогнале во развојот на повеќе модели на процесот на апсорпција и нелинеарност на PK поради заситеноста на пресистемски катаболизам.

Влијание на имуногеноста врз предвидување на mAb PK

Имуногеноста е дополнителен предизвик за предвидување на PK на mAb. Промените во PK-профилот како резултат на постоечките имунолошки механизми кај клиничките видови не можат да се зголемат за луѓето, бидејќи животинските модели не предвидуваат човечки имунолошки одговор на човечки mAbs. Така, или исклучување на позитивни животни со анти-лекови антитела (ADA) од анализа на скалирање на PK, или користење само на раните временски точки пред набудувањето на ADA позитивните сигнали кај овие животни, е стандардна практика во индустријата. Можат да се користат и квантитативни пристапи за да се опишат влијанијата на ADA врз PK и да се овозможи да се предвиди човечкиот PK профил врз основа на PK-профилите што ги мешаат ADA кај мајмуните [Singh, S., 2018]. Моделирањето засновано врз PK/PD механизам е моќна алатка за карактеризирање на почетокот, големината и времетраењето на ефектите од третманот со антитела. Механичките модели на PK/PD често се користат за разјаснување на сложените односи на PK/PD и за расветлување на факторите што ги одредуваат сложените односи на односот дози-одговор. Бројни случаи демонстрираа успешна примена на моделирање на PK/PD за подобрување на ефикасноста и квалитетот на откривање на антитела, нивниот претклинички развој, транслационото истражување и донесување одлуки за клиничкиот развој. Сепак, најголемите предизвици останаа во карактеризацијата на PK/PD на антитела, вклучувајќи ја и високата варијабилност меѓу субјектите, ограничена дистрибуција во целните ткива, нејасните својства на PK/PD, на формата и на појавата на антитела, односите доза-одговор и висока отпорност на третмани со антитела (Слика 17). Овие истражувања дадоа преглед на напредокот, предизвиците и идните насоки во карактеризирањето на својствата на антитела PK/PD и ја истакнува важноста на примената на механизмите засновани на PK/PD моделите во откривањето и развојот на наноантителата (Yu Tang., 2021).



Слика 17. Моделот на овошно дрво ги презентира тековните предизвици и идните насоки за моделирање на фармакокинетиката / фармакодинамиката (PK / PD) на терапевтски антитела. Моделирањето на PK/PD е широко користено за надминување на халиката / фармакодинамиката (PK/PD) на терапевтските антитела. Моделирањето на PK / PD е широко користено за надминување на ленгите поврзани со антитела, вклучувајќи висока варијабилност на PK / PD, мала дистрибуција на ткиво, неостварливо врзување на целта in vivo, предизвици поврзани со антитела, вклучувајќи висока варијабилност на PK / PD, мала дистрибуција на ткиво, неостварлива врзување на целта и висока отпорност на третман (затворено во цврсти линии). Овој преглед дискутираше за идните насоки за моделирање на PK / PD in vivo, и висока отпорност на третман (затворена во цврсти линии). Овој преглед ги дискутираше идните насоки за развој на PK / PDнтителя, имено „високо-обесените плодови“ за моделирање на PK / PD (затворени во цртички) (Yu Tang , *Pharmaceutics* **2021**, 13, 422)

The fruit tree model presents the current challenges and future directions for modeling the pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) of therapeutic antibodies. PK/PD modeling has been widely used to overcome the challenges/pharmacodynamics (PK/PD) of therapeutic antibodies. PK/PD modeling has been widely used to overcome the challenges associated with antibodies, including high PK/PD variability, low tissue distribution, elusive target binding in vivo, challenges associated with antibodies, including high PK/PD variability, low tissue distribution, elusive target binding and high treatment resistance (enclosed in solid lines). This review discussed the future directions for PK/PD modeling in in vivo, and high treatment resistance (enclosed in solid lines). This review discussed the future directions for PK/PD antibody development, namely the “high-hanging fruits” for PK/PD modeling (enclosed in dash lines).

2.2.9. Фармакокинетика на конјугирани моноклонални антитела

Клучни фармакокинетски размислувања за успешно дизајнирање и клиничка примена на конјугираните моноклонални антитела (ADC) во онкологија се врзани со нивната дистрибуција и елиминација

Конјугирани моноклоналните антитела се повеќе се користат во таргет терапија против малигни заболувања. ADC се состојат од потентна цитотоксична

молекула прикачена во тумор-таргетирано антитело со хемиски линкер со просечен однос лек-антитело 3,5-4. Теоријата е да се испорача потентната цитотоксична молекула директно во туморните клетки, штедејќи ги здравите клетки. Додека првичната теорија е едноставна, практичната примена покажа дека е потешко и во моментот се достапни само две ADC и тоа се Трастузумаб емансин и Брентуксимаб ведотин. ADC се големи молекули ~150kDa со дистрибуција на непроменета ADC што е претежно ограничена на плазма, интерстицијална течност и лимфа. Конвективниот проток на течност го олеснува транспорт на ADC преку и помеѓу овие физиолошки медиуми. По интравенска администрација, првиот метод со кој ADC може да помине низ капиларниот сид во интерстицијалната течност на ткивата е со филтрација, или со конвективен проток на плазма преку васкуларни пори (крстосници, фенестри, синусоиди, итн.). Додека има проток на течност во двете насоки преку капиларен сид, нето проток на плазма протеини и ADC во нормални ткива е надвор од крвните садови и е во интерстицијална течност. Студиите за биодистрибуција кај глупци покажуваат дека црниот дроб, слезината, бубрезите, белите дробови и срцето се доминантни органи за дистрибуција на ткива во кратко време по администрацијата; високо перфузирани ткива го достигнуваат својот C_{max} брзо, додека слабо перфузирани ткива достигнуваат C_{max} дури 24 часа после i.v. администрација. Отпорот на проток низ порите се должи на големината, полнењето и хидрофилност на ADC. Бидејќи влијанијата на конјугацијата овие параметри е прикажан степенот на конјугација за промена на биодистрибуцијата.

Мозокот е најнедостапното ткиво за ADC поради целосно ограничување на конвективниот проток низ крвниот мозок бариера. Транспортот преку крвно-мозочната бариера може да зависи од трансцитозата со посредство на FcRn.

Движењето на ADC и другите макромолекули во рамките на интерстицијалниот простор не е конзистентен или предвидлив. Од интерстициумот, ADC може да се земат во лимфни капилари преку (cleft-like junctions). Тие ќе бидат транспортирани преку лимфниот систем со стапка што е се проценува дека е 0,2% од протокот на плазма. По собирањето во торакалниот канал или десниот лимфен канал, ADC повторно ќе влезат во венската циркулација на интерфејс со левата или десната субклавијална вена, соодветно. Рециклирање преку лимфниот систем им овозможува на ADC да избегнат локализирање во ткива што немаат целни молекули.

Табела 1. Дистрибуција на конјугирани моноклонални антитела
Distribution of conjugated monoclonal antibodies

ткива	перфузија	Дистрибуција
Мозок	минимална	минимална
Мускул, кожа, дебело црево, масно	слаба	слаба
Тимус, тенко црево, панкреас, мочен меур	умерена	слаба
Коскена срцевина	умерена	умерено
Срце, бели дробови	висока	умерено
Бубрези	висока	висока
Црн дроб, сплен	максимална	максимална

Дистрибуција во ткива

Дистрибуцијата на ADC во различни ткива и последователната деконјугација, катаболизам и последователно елиминациско влијание влијае на ефикасноста и безбедноста на ADC. ADC може да се отстранат од циркулација со ендцитоза со посредство на рецептори проследена со деградација во лизозомалниот оддел. Од кога ADC имаат релативно мала терапевтска широчина и потребна е внимателна проценка на имуногеноста разбирање на потенцијалното влијание на антителата против лекови врз нивниот PK/PD, безбедноста и ефикасноста. Предклиничките студии сугерираат дека за целосно искоренување на хетероген тумор може да биде важно да се дизајнира оптимален режим на дозирање што може паралелно да ја убие популацијата на антигенски клетки и антиген негативни клетки.

2.2.10. Ритуксимаб

Rituximab [FDA USAN INN], Rituxan; MabThera [трговски имиња]; Синоними: CD20 Mab, анти-CD20 моноклонално антитело; CD20 моноклонално антитело, рекомбинантно; ID: DB00073; CAS: 174722-31-7.

Ритуксимаб е химерно глувчешко/хумано моноклонално антитело кое се произведува со генетски инженеринг во клеточни култури на цицачи користејќи клетки од овариум на кинески хрчак (CHO). Ова IgG1-к антитело содржи глувчешки лесни и тешки ланци на варијабилните региони, и човечки гама 1 тежок ланец и карпа лесен ланец во константните региони (Anand et al., 2008). Ритуксимаб специфично се

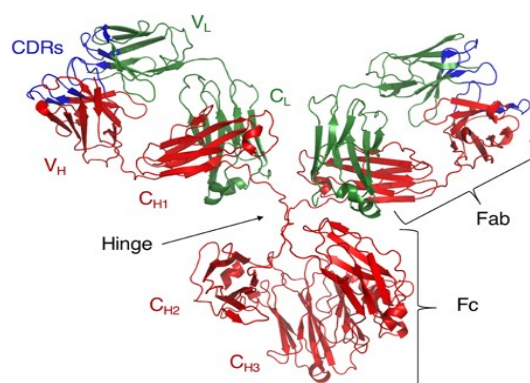
врзува за антиген CD20 (човечки В-лимфоцитен ограничен диференцирачки антиген Bp35) кој се наоѓа на површината на нормалните и малигните В-лимфоцити (Reff et al., 1994). Како и сите антитела на IgG1 класата, ритуксимаб содржи четири полипептиди поврзани преку дисулфидни врски: два лесни и два тешки ланци. Секој лесен ланец се состои од 213 аминокиселини и секој тежок ланец од 451 аминокиселини, соодветно (Drug bank, www.drugbank.ca).

Ритуксимаб – химеричен тежок ланец

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTAD
KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

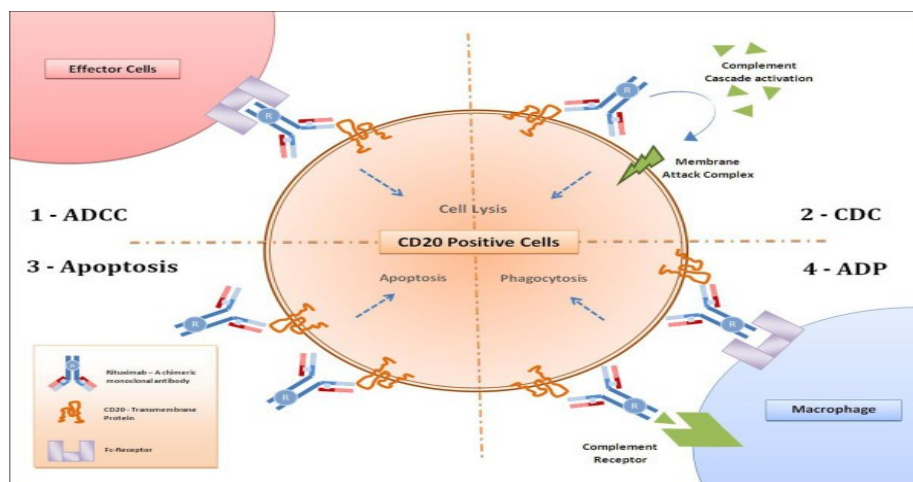
Ритуксимаб – химеричен лесен ланец

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTS
YSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC



Слика 18. Графички приказ на структурата на моноклонално IgG антитело (Janda et al., 2016).

Graphical representation of the structure of a monoclonal IgG antibody



Слика 19. Предложен механизам на дејство на ритуксимаб. (Kasi et al., 2012)

Proposed mechanism of action of rituximab.

Ритуксимаб е во состојба да изврши ин виво биолошки ефекти преку голем број процеси кои главно се зависни од антитела, цитотоксичност зависна од клетки (CDC), цитотоксичност зависна од комплемент (CDC) и директна индукција на апоптоза (Борос и Леузен, 2012). Заради својот ADCC ефект, TMA се врзува за својот специфичен CD20 антиген на клеточната површина на В туморската клетка преку неговите региони за одредување на комплементарноста (CDR) во рамките на променливите региони, додека неговиот Fc γ регион се врзува и ги активира цитолитичките имунолошки клетки како што е природниот убиец (НК) клетки, Т-клетки, макрофаги, итн. За CDC-процесот, што е карактеристика на тип I анти CD20 TMA, антителото кое се врзува за антигенот предизвикува реорганизација на липидните сплавови на клеточната мембрана што активираат комплемент, развој на мембрана комплекс на напади и лиза на клетките. Во меѓувреме, апоптозата се јавува како резултат на активирање на патеките на апоптозата како ефект на директното врзување на TMA со антигенот CD20. Ритуксимаб, е првиот одобрен од FDA, antiCD20 TMA, се применува денес за третман на лимфоми на Б-клетки сам или во комбинација со хемотерапија, радиотерапија или радиоимунотерапевтски агенси. Режимите базирани на ритуксимаб се многу ефикасни за CD20 + лимфоми и стапки на лекување од 50% обично се постигнуваат кај пациенти со некои форми на агресивни HLA (Stononston и соp., 2010). За индолентни типови, одговорите на терапијата се пониски. И покрај CD20 експресијата, некои пациенти се или огноотпорни или релапсираат по режимите базирани на ритуксимаб. Во моментот се проценува дека отпорноста кон ритуксимаб се движи од 30% до 60%, од кои само помалку од една третина е откриено дека го изгубиле изразот CD20 по терапија со ритуксимаб (Rezvani and Maloney, 2011). Ваквите откритија го наметнаа неопходниот развој на пристапи насочени кон подобрување на терапевтските исходи, вклучително и развој на нови анти CD20 TMA и радиоимунотерапија. Радиоимунотерапевтски лекови кои се веќе одобрени за лимфоми, особено индолентни огноотпорни или рецидивирани NHL, се ибритумомаб-90Y и тозитумомаб-131I. Во клиничките испитувања, радиоимунотерапевтијата покажала многу подобра ефикасност и подносливост отколку само на имунотерапија (Witzig et al., 2002).

Целно место на Ритуксимаб: CD20

Добро е проучена лозата на хематопоезиски матични клетки. Подмножество на клетки од оваа хиерархија одговорна за развој на Б-клетките со преминот кон про-Б клетките во коскената срцевина. По ова, тие созреваат во претходни Б-клетки, а

потоа незрели Б-клетки кои поседуваат зрел регион на рецептори на Б-клетки (BCR) изразени од VDJ преуредени тешки и VJ преуредени гени со лесен ланец способни да препознаат специфични антигени. Токму во овој момент незрелите Б-клетки се негативно избрани против за самореактивност (Adams, H., 2009). По ова, преостанатите незрели Б-клетки се движат од коскената срцевина, созреваат во фоликуларни или маргинални зони Б-клетки. Изразувањето на CD20 започнува во раната фаза на незрели Б-клетки, но не е изразено пред таа точка и не е познато дека се изразува на други нормални клетки на телото што го направи релативно безбедна и ефективна цел против рак (Boross, P., 2012). CD20 е тетра-трансмембрански протеин со интрацелуларен N- и C-терминален регион и две вонклеточни јамки, генерално наречени мала и голема јамка, и се дел од пептидот кој е насочен кон сегашните терапевтски mAbs (Слика 20) (Pierpont TM., 2018). Настрана фактот дека CD20 се изразува како дел од развојот на Б-клетките, многу малку се знае за неговата реална биолошка функција. Познато е дека е вклучено во прилив на калциум во продавницата и губење на цитоплазматски дел од CD20 го инхибира активираниот внес на калциум со посредство на BCR (Boross, P., 2012). Исто така, ектопичното изразување на CD20 кај фибробластите предизвикува спроводливост на калциум, слично на онаа на Б-лимфоцитите. Иако се верува дека игра улога во развојот и активирањето на Б-клетките преку наплив на калциум, останува нејасно дали самиот протеин е калциум јонски канал или кои други сигнални патишта ги активира за да се донесе оваа функција. И покрај доказите за нејзината важност во функцијата на Б-клетките, CD20 - / - глумците не содржат бруто фенотип, имаат нормален животен век, репродуктивен успех и нормална подложност на инфекција. Изненадувачки, дури и развојот на Б-клетките беше главно нормален кај CD20 - / - глумците, а главниот наод беше намален одговор на калциум по лигатура на IgM. Овие податоци за животински модел ја зајакнуваат теоријата дека CD20 е вклучен во внесувањето на калциум во Б-клетките, но биолошкото значење на таа улога и употребените механизми што го олеснуваат

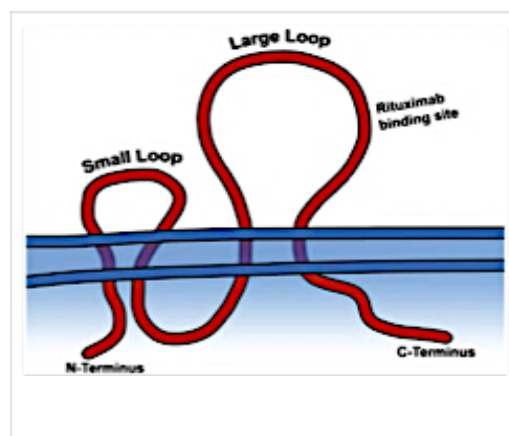
придружниот прилив на калциум остануваат нерешени.

2.2.11. Бифункционални хелаторни агенси

Лиганди кои најчесто се користат за успешно радиообележување на антителата се бифункционални хелаторни агенси (анг. Bifunctional chelating agents, BFCAs), чија цел е добивање на фармакокинетски и фармакодинамски стабилни радиофармацевтици без ризик од деградација на радиометал-антитело комплексот во физиолошки услови. Бифункционалните хелатори ковалентно се врзуваат за биомолекулата на едната страна, а на другата координативно за радионуклидот. Ковалентното врзување за биомолекулата може да биде или директно или преку т.н Фармакокинетски линкери (анг. PKM linkers) чија цел е модификација на кинетиката на екскреција на биомолекулата за да биде оптимизиран нивниот T/B однос (анг. Tumor/Background ratio) преку намалување на нивното превземање од страна на не-таргетираните органи а задржување на високото туморскопревземање. (Liu S., 2008)

Врзувањето на бифункционалните хелатори со антителата е ковалентно, преку комплементарни функционални групи за конјугација. Има различни електрофилни групи, како што се реактивните естри (пр.NHS), изотиоцијанатите, анхидридите, јодоацетамидите, малеимидите, кои можат да се поврзат со молекулите на хелаторите со цел постигнување на полесна конјугација. Едни од најчестите реактивни групи во состав на антителата преку кои се врши конјугацијата се аминокиселините и тоа алифатичната ϵ -амино група во состав на аминокиселината Лизин и α -амино групата на N-терминалните аминокиселини, како и слободните тиол групи кои се дел од аминокиселината Цистеин. Тиолите за успешна конјугација имаат потреба од неутрална pH на средината за разлика од амините за чија што успешна конјугација е потребна алкална средина (pH 7.2-9). NHS, изотиоцијанатите и анхидридите може да се сметаат за највообичаени реактивни електрофилни групи кои можат да реагираат со ϵ -амино групата од лизинот во алкални услови и да

Слика 20. Врзивно место на Ритуксимаб
(Pierpont TM., 2018)
Rituximab binding site



формираат ковалентни врски и тоа, при реакција на NHS и аминокислотната група од антителото, како и при реакција на киселинските анхидриди, како што е DTPA, кои содржат две амин реактивни анхидридни групи кои реагираат со N-терминалните и ϵ -амино групите при што се формираат амидни врски. Тиоуреа врзувањето од друга страна, настанува при реакција на аминокислотната група од Лизин остатоците на антителото и изотиоцијанатната група на хелаторите (Sesay M, 2003).

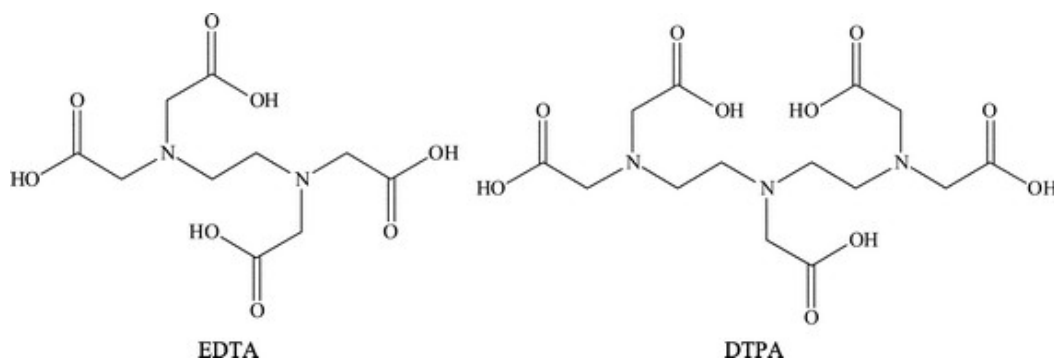
Бифункционалните хелатори треба да обезбедат термодинамички стабилни и кинетски инертни комплекси, брза реакција (при ниска температура и концентрација), флексибилна хемија на конјугација и да бидат лесно достапни. Многу важно својство на хелаторот е и да не ги менува биолошките својства и специфичноста на антителото. Кога се синтетизира нов хелатор или пак се испитува употребата на веќе постоечки хелатор, но обележан со нов радиометал, првичните скрининг истражувања се прават со едноставно радиообележување за утврдување на бројни фактори и тоа: дали хелаторот може да го поврзе радиометалниот јон и да настане радиообележување со висок принос, каква температура е посакувана (собната температура е најдобра) и колку време и е потребно на реакцијата (пократкото е подобро). За кратко живечките изотопи, како што е ^{68}Ga , идеални хелатори се оние кои радиообележувањето го прават брзо (брза кинетика на радиообележување). Иако долго живечките радионуклиди како што се ^{111}In и ^{177}Lu овозможуваат продолжено време за реакција, при формулирање на радиофармацевтици најдобро е делот на радиообележување да не трае подолго од 10-15 минути. Кога со раниот скрининг ќе се одреди дека хелаторот поседува својства за радиообележување со одреден радиометален јон, понатаму треба да се направат истражувања со цел да се одреди дека добиениот радиометал-хелатор комплекс е стабилен и инертен. Кинетичката инертност *in vivo* е најважен параметар дури и над абсолютната термодинамичка стабилност на радиометал-хелатор комплексот. Одредувањето на константите за термодинамичка стабилност ($K_{ML} = [\text{ML}]/[\text{M}][\text{L}]$) најчесто се врши со потенциометриска или спектрофотометриска титрација, и можат да бидат корисни за прелиминарна споредба на разни хелатори со одреден метален јон, но тие не ја предвидуваат *in vivo* стабилноста. Термодинамички параметар кој обезбедува повеќе биолошки релевантни информации од вредноста на K_{ML} е вредноста на pM , која претставува негативен логаритам од концентрацијата на слободен радиометален јон некомплексан од даден хелатор под специфични услови. Овие две вредности ја одредуваат рамнотежата на реакцијата на координација на

радиометал-хелаторот под специфични услови, но не даваат кинетички информации, како што е стапката на дисоцијација. Ова е многу важен фактор бидејќи стапката на дисоцијација *in vivo* е она што управува со кинетичката инертност на радионуклидниот комплекс без оглед на термодинамичката стабилност. Истражувања на стапката на дисоцијација се прават во услови соодветни на оние *in vivo*, за да се одреди можната радиометална загуба во физиолошки услови. Резултатот од ваквата загуба е не-таргетирана дистрибуција на слободниот метален јон во организмот која зависи од неговите својства и биолошкото однесување. Пр. ^{89}Zr и ^{68}Ga се акумулираат во коските додека ^{64}Cu се акумулира во црниот дроб. Судбината на металниот јон може да се следи со употреба на ПЕТ/СПЕКТ кај живи животни или со биодистрибуциски експерименти. Секој радиометален јон има уникатни својства што мора да се земат во предвид пред да се формулираат радиофармацевтиците, како што се хемијата на хидролиза, редокс хемијата и афинитетот за нативни биолошки хелатори. Дополнителна компликација претставува присуството на многу силни природни биолошки хелатори и конкурентски јони кои можат да доведат до трансхелација на радиометалот од BFC-конјугатите. Тие се често присутни во повисоки концентрации од радиофармацевтикот. Тука се вбројуваат транспортните протеини како што се трансферин, церулоплазмин и металотионин, потоа протеини за складирање како што е феритинот и ензими кои содржат метали како што е супероксид дизмутаза. Овој широк спектар на комплицирачки фактори значи дека *in vitro* анализите обично не се точни во предвидувањето на *in vivo* стабилноста. Со инкубација на радиометалните хелатори со мешавина од вакви конкуренти, количината на радиометален јон што ќе се трансхелира од хелаторот во серумските протеини/ензими може да се одреди со употреба на SEC HPLC, TLC или еднократни PD-10 SE колони. Дополнително, многу често во ваквите *in vitro* анализи, концентрацијата на биолошките хелатори се зголемува над нормалните физиолошки нивоа за да се добијат уште посигурни резултати. Овие истражувања обезбедуваат директни релеватни мерки на стабилност и кинетска инертност по пат на конкуренција со најверојатните виновници за трансхелација *in vivo*. (Price E, Orvig C., 2014). Изборот на бифункционален хелатор кој ќе се користи за формулирање на радиофармацевтик зависи од изборот на радионуклидот. Веќе споменавме дека хелаторот формира координативни врски со централниот метален јон. Во зависност од големината, полнежот и електронската конфигурација на радиометалот, координативниот број на хелаторот се движи од 2 до 8 (Sarko D

et al, 2012).

2.2.11.1. Ациклични бифункционални хелаторни агенси

Првите хелаторни средства откриени и истражувани за радиообележување на биомолекулите биле ацикличните хелатори. Како што кажува и името, на ацикличните хелатори им недостасува прстенест систем во нивниот координативен облик споредбено со макроциклични техелатори. Најчесто користени ациклични хелатори се дериватите на Диетилен-триамин-пентаоцетна киселина (анг.diethylene-triamine penta acetic acid, DTPA), кој самиот води потекло од сличниот хелатор етилен-диамин тетра оцетна киселина (анг.ethylene-diamine-tetraacetic acid,EDTA). Кај EDTA биле откриени недостатоци во поглед на стабилноста и координативните особини што резултирало со синтеза на DTPA и нејзините деривати.



Слика 21. Структура на DTPA и EDTA (Nash KL et al., 2012)
Structure of DTPA and EDTA

DTPA бил успешно употребуван како бифункционален хелатор кај FDA-одобреното SPECT средство OctreoScan® (^{111}In -DTPA-octreotide), пептиден конјугат насочен кон соматостатин за визуелизација на невроендокрини тумори. DTPA е способен за врзување со различни радиометали како што се ^{64}Cu , ^{111}In , ^{177}Lu , $^{86/90}\text{Y}$. После врзување со протеинските примарни amino групи, добиениот конјугиран ацикличен хелаторен систем се отвара со цел да ја открие својата октадентатна природа. Тоа е затоа што поседува осум донорни места за интеракција со лиганди, па од тука конјугацијата со DTPA може да се смета за хекса-или окта-координација во зависност од природата на радиометалот. Ацикличните хелатори се способни квантитативно да го поврзат радиометалот за помалку од 15 минути на собна температура, што е од клучно значење за конјугација на чувствителни молекули како што се антителата и нивните деривати или кога радиообележувањето се врши со изотопи со краток полу-живот. Условите на

реакцијата и изборот на BFC мора да бидат така одбрани да не влијаат на имуногеноста на антителото. DTPA дериватот 1B4M-DTPA(2-(4-isothiocyanatobenzyl)-6-methyl-diethylene-triaminepentaacetic acid) или уште познат како Tiuxetan, е класичен пример за BFC со кој е формулиран радиофармацевтик кој ја истакнува успешната употреба на анти-CD20 радиотерапијата во однос на употребата на голомоноклонално антитело како што е Rituximab. 1B4M-DTPA е дериват на DTPA кој содржи дополнителна -CH₃група на една од страничните етилен групи и бил успешно искористен за формулирање на FDA-одобрениот ⁹⁰Y имуноконјугат Zevalin®(⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan) за третман на Не-Хоџкинов лимфом. Воведувањето на дополнителни странични групи во состав на DTPAовозможува подобро конјугирање со антителата.

Таков пример е p-SCN-Bn-DTPA(2-(4-isothiocyanatobenzyl)-diethylene-triamine-pentaaceticacid), DTPA дериват кој преку изотиоцијанатната група се врзува со слободната аминокислота група кај антителото и формира стабилна тиауреа врска.

Еден од проблемите поврзани со конјугацијата со DTPA е синтезата на непосакувани конјугати, како што се двојно супституираните DTPA аналози добиени со DTPA дианхидридот. За да се избегне ова, биле синтетизирани DTPA деривати како што е tetra-t-Bu-DTPA кој содржи само една слободна карбоксилна група, па се елиминира можноста за формирање двојно супституирани DTPA деривати. Иако DTPA со години бил детално проучуван, неговата ниска *in vivo* стабилност го намалува неговиот клинички потенцијал како резултат на дисоцијација на радионуклидот од антитело-DTPA конјугатот. Ова може да води до сериозен штетен ефект врз чувствителната коскена срцевина. Дисоцијацијата на радионуклидот од DTPA се појавува поради отворање на хелатниот прстен. Барани се методи и модификации на DTPA со цел ограничување на слободата на движење на овој хелатен прстен и обезбедување на енергетска пречка за отворање на ацикличниот скелет. Пример за ваков дериват на DTPA преку кој се надминати ваквите недостатоци е CHX-DTPA (cyclohexane-1,2-diamine- N,N,N',N'-tetraacetate). CHX- DTPA содржи trans-циклохексиланен мост што го прави хелаторот поригиден и наметнува одреден степен на преорганизација на местото на врзување на металните јони, зајакнувајќи ја кинетичката инертност, но, истовремено намалувајќи ја брзината на радиообележување споредено со DTPA. Радионуклидот е стабилизирани во хелаторниот прстенест систем резултирајќи со намалување на веројатноста од дисоцијација. Постојат две достапни изомерни форми на CHX-DTPA, и тоа CHX-A"-DTPA и CHX-B"-DTPA. CHX-A"-DTPA поседува

поголема стабилност *in vivo* и генерално е повеќе посакуван хелатор за радиообележување на моноклонални антитела во однос на неговиот изомер. (Sugiura G., 2014; Orvig PE., 2014) (Sarko D., 2012). Друга стратегија да се надмине проблемот со дисоцијација кај бифункционалните DTPA деривати бил барање на постабилни хелаторни средства, што доведува до се поголем употреба на Макроцикличните хелатори.

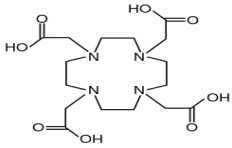
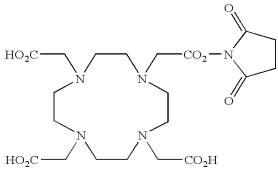
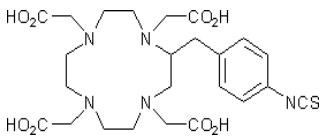
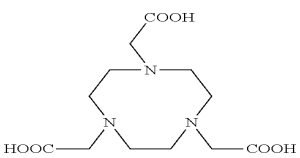
2.2.11.2. Макроциклични бифункционални хелаторни агенси

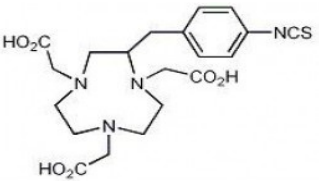
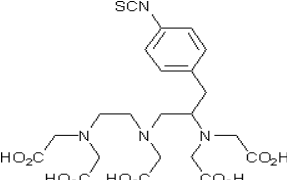
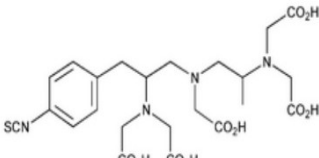
Цикличните полиамино-поликарбоксилати уште познати и како макроциклични хелатори, се составени од тетраза- или триаза- макроцикличен прстен. Макроцикличната основа овозможува формирање на високо термодинамички стабилни метални комплекси со голема кинетичка инертност. 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) е соодветна замена за DTPA. Синтезата на DOTA за прв пат била опишана од страна на Stetter and Frank во 1976 и вклучувала реакција помеѓу циклен и хлорооцетна киселина во водени алкални услови. Ефикасноста на DOTA и за дијагностичка и терапевтска примена во нуклеарната медицина се должи на високата кинетичка стабилност на комплексите кои ги формира. Во онкологијата, постигнат е голем напредок со употреба на DOTA за подготовка на контрастни средства за магнетна резонанција (MRI). Покрај тоа, контрастните средства засновани на макроциклични хелатори гарантираат дека Gd^{3+} - комплексите се во споредба со комплексите на DTPA кинетички поинертни. DOTA исто така е поволен бифункционален хелатор за подготовка на терапевтски лантанидни радиофармацевтски производи. DOTA и нејзините деривати формираат стабилни комплекси со различни радиометали меѓу кои и ^{111}In , $^{86/90}Y$, ^{211}Bi , ^{225}Ac , ^{67}Ga и други. Макроцикличните хелатори бараат минимална физичка манипулација за време на координацијата со радиометалниот јон, бидејќи тие поседуваат природна ригидна структура и делумно претходно организирани места за врзување со металниот јон, со што се намалува загубата на ентропија при координација. Ацикличните хелатори од друга страна мора да подлежат на промени во физичката ориентација и геометрија во раствор со цел да се добијат донорски групи кои ќе координираат со радиометалниот јон и како последица на тоа кај нив имаме сигнификантно намалување на ентропијата (термодинамички неповолни) Ограничувањата на DOTA дериватите се директно поврзани со нивната извонредна стабилност, односно ваквата стабилност води до побавно формирање на комплекси што ги компромитира и приносот од радиообележување и ефикасноста и специфичноста. Доколку конјугираниот

производ е толерантен на кратко загревање (најчесто на температура од 60-95°C, 30-90 минути) овој недостаток може да биде надминат. (Lacoeuille F., 2018; Price E., 2014; Brechbiel M., 2008). Многу напори биле вложени да се формулираат стабилни имуноконјугати за анти- HER2 моноклоналното антитело трастузумаб со различни видови на бифункционални хелаторни агенси за понатамошно врзување со радионуклиди кои ќе се употребуваат за дијагностика или радиотерапија. За време на изработката на оваа досертација ги разгледавме разгледаме најистражуваните бифункционални хелатори за радиообележување на моноклонални антитела (ритуксимаб) и тоа DOTA, DTPA и неговите деривати p-SCN-Bn-DTPA и p-SCN-Bn-1B4M-DTPA преку различните студии во кои е истражувана нивната употреба за успешна конјугација и радиообележување со различни радионуклиди и најчесто употребуваните техники за испитување на интегритетот на ваквите имуноконјугати.

Даден е список на најчесто сретнувани BFC за радиоозначување во радиофармацевтски производи базирани на итриум и лутетиум (Brechbiel, 2008).

Табела 2. Најчесто користени бифункционални хелатни агенси
(Parus L., 2015)
Commonly used bifunctional chelating agents

Структура	Име	Ацикличен / цикличен
	DOTA	цикличен
	DOTA-NHS ester	цикличен
	p-SCN-Bn-DOTA	цикличен
	NOTA	цикличен

	p-SCN-Bn-NOTA	цикличен
	p-SCN-Bn-1B-DTPA	ацикличен
	p-SCN-Bn-1B4M-DTPA	ацикличен

2.2.11.3. Имуноконјугати

Рекомбинантните mAbs веќе одобрени за третман на малигни заболувања покажуваат различни нивоа на активност кај неколку видови на тумори. Сепак, ефикасниот и пролонгиран интратуморен внес на mAb поради различни биолошки фактори, бариери на врзувачките места и антигенската хетерогеност, останува проблем за терапевтската ефикасност на mAb. Покрај тоа, дури и кога ќе се постигне акумулација на mAb во целните ткива, терапевтската ефикасност често е ограничена од страна на степенот до кој ADCC, CDC или индукцијата на сигнализацијата води до клеточна смрт (Wu and Senter, 2005). Со цел да се зголеми терапевтската ефикасност немодифицираните mAbs се поврзуваат со лекови, токсини и радионуклиди. Веќе три конјугати на рекомбинантни моноклонални антитела се одобрени за терапија на рак: два радиоимуноконјугати, ibritumomab tiuxetan, Zevalin® (CD20-специфично IgG₁к радиообележано со ⁹⁰Y) (Wiseman., 1999) и tositumomab, Bexxar® (CD20-специфично IgG2aλ радиообележано со ¹³¹I) (Kaminski et al., 2000) и еден имунотоксин, gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®). Имуноконјугатите се примери на антитела дизајнирани специјално за да ги предадат своите токсични оптоварувања директно на клетките на ракот. Моментално се истражуваат голем број рекомбинантни mAbs вооружени со различни радионуклиди, токсини како доксорубицин, калихеамицин и други (Wu and Senter, 2005).

2.2.11.4. Радиофармацевтски препарати

Радиофармацевтските препарати се лекови кои содржат радионуклиди, и вообичаено се користат во нуклеарната медицина за дијагноза или терапија на различни болести. Речиси сите радиофармацевтски препарати се администрираат преку интравенска инјекција. Тие по структура се претежно мали органски или неоргански соединенија со определен состав. Но, исто така, може да бидат макромолекули како моноклонални антитела и фрагментирани антитела. Во зависност од нивната медицинска апликација, радиофармацевтските препарати може да се поделат во две основни класи: за дијагностика и терапија. Исто така, може да се класифицираат и според нивните биодистрибуциски карактеристики: оние чија биодистрибуција се определува исклучиво според нивните хемиски и физички својства; и оние чија крајна дистрибуција се утврдува од страна на нивните рецептор-врзувачки или други биолошки интеракции. Припадниците во втората класа често се нарекуваат и целно-специфични радиофармацевтици (Banerjee., 2001; Jurisson., 1999; Liu., 2002; Liu, 2004; Reichert.,1999). Дијагностичките радиофармацевтици се молекули обележани со гама- емитирачки изотопи наменети за СПЕКТ или позитрон емитирачки-изотопи наменети за ПЕТ. Во принцип, дијагностичките радиофармацевтски препарати се користат во многу ниски концентрации, во опсег од 10^{-6} - 10^{-8} M, и не се наменети да имаат било каков фармаколошки ефект. Целта на дијагностичката апликација е детален опис на морфолошката структура на органи или ткива и на прво место тестирање на нивната физиолошка функција преку акумулација на радионуклидот. Дијагностичките радиофармацевтици се претежно метални комплекси со органски хелатор за метал-есенцијалните агенси или со бифункционален хелирачки агенс за целно-специфичните радиофармацевтици. Во некои случаи, може да бидат и органски молекули поврзани со неметален радионуклид, како што се ^{18}F и ^{125}I . Дијагностичките радиофармацевтици обезбедуваат неинвазивен метод за дијагностицирање на болеста и следење на ефектот од терапијата.

Терапевтските радиофармацевтици се молекули дизајнирани така да можат да достават терапевтски дози на јонизирачко зрачење на точно одредено место. Радиотерапијата е во употреба некаде повеќе од четири децении почнувајќи со употребата на радиојод за третман на нарушувања на тироидната жлезда. Системската администрација на радиофармацевтици наменети за специфична локализација во туморот обезбедува можности за третман на распространети метастатски тумори (Volkert and Hoffman, 1999; McEwan, 1997). Идеално, терапевтскиот радиофармацевтик треба да се локализира на целното место во

доволна концентрација за да овозможи цитотоксична доза на зрачење на туморските клетки, и брзо да се елиминира од крвта и другите органи за да го минимизира оштетувањето од зрачењето во здравите ткива.

Целно-специфичните радиофармацевтици се базирани на рецепторното врзување на радиообележаниот рецепторен лиганд на целното ткиво за терапија (Liu and Edwards, 2001; Anderson and Welch, 1999; Heeg and Jurisson, 1999). Во принцип, целно-специфичниот радиофармацевтик може да се подели на три дела: биомолекула-носач (BM), бифункционален конјугирачки или хелирачки агенс (BFCA), и радионуклид (M) (Liu, 2008) (Слика 22).



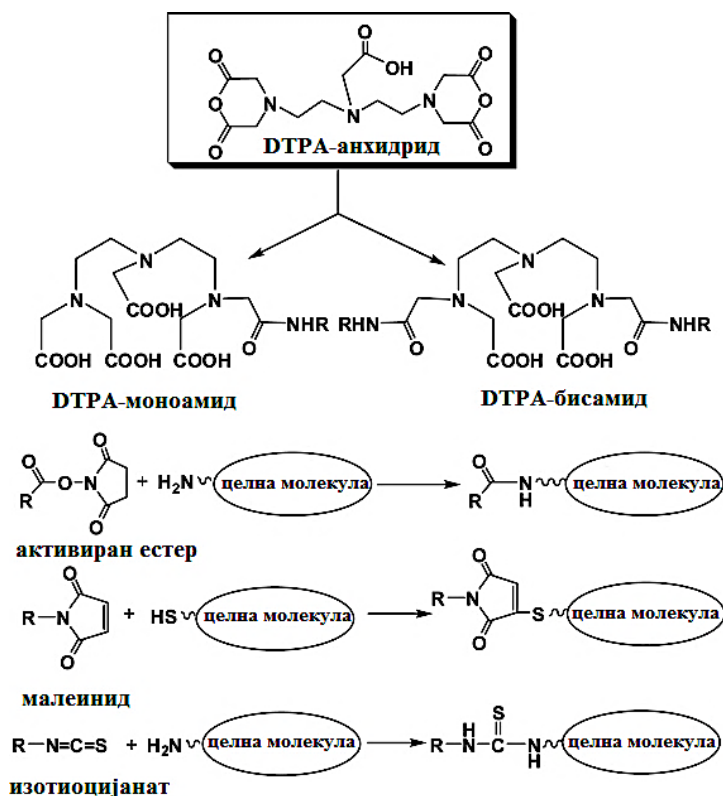
Слика 22: Компоненти на целно-специфичниот радиофармацевтик
Components of the target-specific radiopharmaceutical

Биомолекулата која е всушност рецепторен лиганд, служи како "носач" за специфична испорака на радионуклиди до целното ткиво, за кое е познато дека содржи значителна концентрација на целни рецептори. Овој радиообележан рецепторен лиганд се врзува за рецепторите со висок афинитет и специфичност, што резултира со селективно навлегувањето на радиофармацевтикот.

Многу биомолекули, вклучувајќи моноклонални антитела, мали пептиди, или непептидни рецепторни лиганди, успешно се користат за целно специфична испорака на радионуклиди (Heppeler., 2000; Liu., 2005; Signore., 2001; Liu., 2006; Arano et al., 1991; Janevik-Ivanovska et al., 1997). Во Табелата 2 се дадени избрани комерцијални целно-специфични радиофармацевтици базирани на пептиди и моноклонални антитела одобрени од FDA за дијагноза или терапија на заболувања, како што се тромбоза и канцер.

2.2.11.5. Конјугирачки групи

Развиени се голем број на техники за конјугација и модификација на биомолекулите. Конјугирачките групи за прикачување на BFCA кон биомолекулите вклучуваат анхидрид, бром-или јодоацетамид, изотиоцијанат, NHS-естер, и малеимид. Овие конјугирачки групи се електрофилни, и бараат нуклеофилна функционалност во биомолекулата. Во некои случаи, ако биомолекулата од интерес содржи само електрофилна функционална група (на пример карбоксилна киселина), потребна е понатамошна синтетичка промена. Во овие случаи, често се користи бис-нуклеофилен реагенси, како што се етилендиамин или пропилендиамин, за претворање на електрофилната во нуклеофилна група. Овие реактивни групи, без разлика дали тие се природно дел од биомолекулата или се вештачки имплементирани, може да послужат како места за конјугација на BFCA. Изборот на конјугирачка група е во голема мера зависен од ваквите места во биомолекулите. Многу често ваквото место е примарен амин или тиолна група. Функционалните групи реактивни кон примарни амини се DTPA дианхидрид, NHS-активирани естери, и изотиоцијанати додека пак малеимидот е многу реактивен кон тиолите (Liu, 2008).



Слика 23: Конјугирачки групи за ациклични и макроциклични BFCA
Conjugate groups for acyclic and macrocyclic BFCA

Терапевтски радионуклиди (Yttrium-90 и Lutetium-177)

Од првиот извештај за поволните ефекти на инјектираниот радиоактивен радиум во 1913 година, низата и примената на радиоизотопи што емитуваат честички се зголемија неверојатно (Yeong et al., 2014). Тие се група на разновидни радионуклиди со различни хемиски и физички својства. Како и да е, заедничката карактеристика на терапевтските радионуклиди е тоа што тие се емитери на честички со висок линеарен трансфер на енергија (LET). Во моментот, најчесто користените радионуклиди се етатори на бета и алфа честички. Примери на емитери на бета честички се јод-131, итриум-90 и лутетиум- 90, додека примери на алфа-емитери се радиум-223 и астатин-211.

Табела 3 подолу ги сумира карактеристиките на најчесто користените и испитувани терапевтски радионуклиди.

Табела 3. Карактеристики на најчесто користени терапевтски радионуклиди (Yeong., 2014; Srivastava, 2013)

Characteristics of commonly used therapeutically used radionuclides

Радионуклид	Начин на распаѓање	Полу - живот	E-max (MeV)	Максимален опсег на меки ткива (мм)	Се користи за визуелизација	Гама енергија (keV)
⁹⁰ Y итриум	β-	2.7 дена	2.3	11	не	-
¹⁷⁷ Lu лутециум	β-	6.7 дена	0.5	1.7	да	208
¹³¹ I јод	β-, γ	8.0 дена	0.6	2.4	да	364.5
⁸⁹ Sr стронциум	β-	50.5 дена	1.5	8.0	не	-
¹⁸⁸ Re рениум	β-, γ	17 часа	2.1	11	да	155
¹⁸⁶ Re рениум	β-, γ	3.7 дена	1.1	3.2	да	137
¹⁵³ Sm самариум	β-, γ	46.5 часа	0.8	3.1	да	103
³² P фосфор	β-	14.3 дена	1.7	7.9	не	-

Изборот на радионуклид што треба да се користи во развојот на радиофармацевтски производи зависи од достапноста на радионуклидот, а исто така и од неговите физички својства, хемиските својства и биолошките својства, сето тоа треба да се совпадне со предвидената клиничка употреба на радиофармацевтскиот систем. Физички, радионуклидот треба да има висок принос на зрачење на честички со соодветна енергија. Полуживотот, особено за

радиофармацевтски производи базирани на антитела, треба соодветно да се совпадне со ин виво фармакокинетиката на насоченото антитело. Бидејќи биолошкиот полуживот на многу ТМА е околу три дена, пожелно е терапевтските радионуклиди за радиоозначување ТМА да имаат физички полуживот од околу три до седум дена. Пократко живечките може да не дозволат доволна акумулација на радиоактивност на местото на туморот, додека предолгиот полуживот може да ги изложи пациентите на прекумерни дози на зрачење, освен нивната помала ефикасност. Идеално, терапевтските радионуклиди треба да бидат лишени од нечестички зрачење. Сепак, истовремената емисија на соодветни енергетски гама зраци е всушност посакувана карактеристика на „идеалните“ тераностички радионуклиди бидејќи ја олеснува дозиметријата и следењето на терапијата. Емитираните честички исто така мора да бидат со соодветна енергија. Ако енергијата е превисока, токсичноста на ненасочените ткива е веројатно поголема од прифатливата, додека честичките со мала енергија веројатно се неефикасни. Алфа честичките се со голема енергија, но бидејќи нивниот опсег на ткива е многу мал, нивниот LET е многу висок и погоден за лекување на микрометастази во туморот. Од друга страна, бета честичките имаат променлива енергија, а бета-енергетските се повеќе продорни, но со низок LET. Од таа причина, радиоизотопите кои емитуваат бета на висока енергија се погодни за насочување кон големи туморски маси. Бидејќи бета-пониските енергии имаат многу висок LET и низок опсег на ткиво, тие се посоодветни за таргетирање на микрометастази во туморот отколку големите туморски маси. Во прилог на горенаведеното е и условот за соодветна хемија на радионуклидот. Хемиските својства на радиоизотопот треба да овозможат брзо, силно и кинетички стабилно прицврстување на радионуклидот кон молекулата на таргетирање. Од еднаква важност е достапноста на радиоизотопот. Радиоизотопот што е премногу тешко да се добие во соодветни количини, веројатно нема да има значителна корист за грижата за пациентот.

Лутециумот е лантаниден елемент, со атомски број 71 и електронска конфигурација на [Xe] 4f¹⁴5d¹6s². Лутетиум-177 е најчестиот применет радиоизотоп на лутетиум за радиотерапија со внатрешна доза. Се распаѓа 100% преку бета емисија на хафниум-177, за полуживот од 6,65 дена (ММ Бе 2004 Vol. 2-A = 151 до 242). Бета честичките на лутетиум-177 имаат максимална енергија од 497,8 кеВ и максимален опсег на ткиво од 1,7 мм, како што е прикажано на табелата 1 погоре. Како и другите лантаниди, во хемијата на лутетиумот доминира неговата состојба на оксидација +3. Нејзините стабилни комплекси се оние со мулти-забни лиганди составени од

тврди донатори лиганди, како што се амини групи и карбоксилатни групи, во кои неговите координативни броеви се движат од 6 до 9 (L. Pagus et al., 2015) Лутециум-177 се произведува во нуклеарни реактори со неутрално зрачење на лутетиум-176 или од неутронско зрачење на итербиум-176 проследено со бета распаѓање на добиениот итербиум-177 MM Be 2004 Vol. 2-A = 151 до 242). Се испорачува на радиофармацевтите како $^{177}\text{LuCl}_3$. Лутециум-177 моментално се применува во ^{177}Lu -DOTATATE за терапија на рецептори на соматостатин (SSTR) со преголем израз на невроендокрини тумори (NET) (Strosberg et al., 2017).

2.2.12. Радиообележување на антитела

Радиоактивното обележување на антителата може да се постигне директно или индиректно во зависност од хемијата на радиоизотопите (Tolmachev ., 2014). Пристапот за директно обележување со радионуклиди е соодветен за радионуклиди чија хемија овозможува директно и силно поврзување со остатоците од аминокиселините на молекулите на антителата.

2.2.13. Радиообележување на DTPA-ВМ конјугати

Главната предност на користење на DTPA аналози како BFCA е нивната екстремно висока радиообележувачка ефикасност под благи услови, но кинетичката лабилност на нивните метални комплекси често резултира со дисоцијација на радиоизотопот од металниот комплекс. Stimmel et al., 1995 и Stimmel и Kull, 1998, проучувале Y-90, Sm-153 и Lu-177 хелирачки својства на DOTA и DTPA аналози, и заклучиле дека Y-90 хелирачката ефикасност на ацикличните BFCA (Слика 1.6: DTPA, нитро-CHX-A-DTPA, и нитро-MX-DTPA или 1B4M-DTPA) е многу повисока од онаа на макроцикличните BFCA, и дека контаминацијата од метали во траги има минимален ефект на радиоактивното обележување.

2.2.13.1. Термодинамичка стабилност

Откако радиофармацевтот ќе се инјектира во крвта, неговата концентрација може да стане толку ниска што дисоцијацијата на радиоизотопот од неговиот метален комплекс на крајот ќе биде фаворизирана. Губењето на радиоизотопот може да резултира со акумулација на радиоактивност во не-целните органи. Постојат податоци дека Y-90 и лантанидните изотопи лесно се депонираат во коските (Ando et al., 1989). Ако слободен Y-90 се инјектира на човечки субјект, околу 50% од инјектираната доза ќе се локализираат во коските, 25% од инјектираната доза ќе се насочат во црниот дроб, 10% од инјектираната доза рамномерно ќе се

распоредат во многу други органи, додека само 15% од инјектираната доза се излучува преку бубрежниот систем. Затоа, BFCA мора да формираат метални хелати со висока термодинамичка стабилност за да го задржат својот хемиски интегритет во конкуренцијата со природните хелатори, како што е трансферинот. Сепак, високата термодинамичка стабилност не е единствениот услов. Впрочем, стабилноста на растворот на радиофармацевтскиот препарат во крвта пред сè, е определена од страна на кинетичката инертност, а не од термодинамичката стабилност на металниот комплекс.

2.2.13.2. Кинетичка инертност

Терминот кинетичка инертност се однесува на стапката на дисоцијација на радионуклидот од металниот комплекс. Дисоцијационата кинетика игра значајна улога за *in vivo* стабилноста на радиофармацевтскиот препарат. Додека брзата дисоцијациона кинетика е карактеристична за металните комплекси на ацикличните BFCA (McMurry., 1998; Wu., 1997; Cummins., 1991; Camera., 1994; Brechbiel, 1991; Pippin., 1992), податоци од литературата покажуваат дека металните комплекси на макроцикличните хелатори се кинетички поинертни (Stimmel., 1995; Stimmel, 1998; Liu., 2001; Kukis., 1998; Jang., 1999). Ова е покажано со високата стабилност на растворите на ^{90}Y -обележаните DOTA-BM конјугати (Caravan., 1999). Важно е да се потенцира и дека изборот на кинетичките карактеристики за металниот комплекс на BFCA, исто така, зависи и од фармакокинетиката на радионуклидот. Радиообележаните антители имаат долг биолошки полуживот во циркулацијата на крвта и на местото на туморот. Бидејќи тие често се метаболизираат во црниот дроб, радиометалниот комплекс мора да има исклучително висока термодинамичка стабилност и кинетичка инертност за да ја издржи конкуренцијата од металните јони и природните хелатори во циркулацијата на крвта и да го толерира хепатобилијарниот метаболизам. За радиообележаните мали биомолекули (пептиди), нивниот биолошки полуживот во крвта е многу пократок од оној на радиообележаните антители и фрагменти од антители. Меѓутоа, барањето на кинетичка инертност за BFCA во радиометалните комплекси не мора да биде ограничувачко. Главната цел сепак во изборот на успешен BFCA е да се минимизира *in vivo* дисоцијацијата на радионуклидот од радиометалниот комплекс во радиофармацевтскиот.

2.2.14. Техники за определување на интегритет, чистота како и

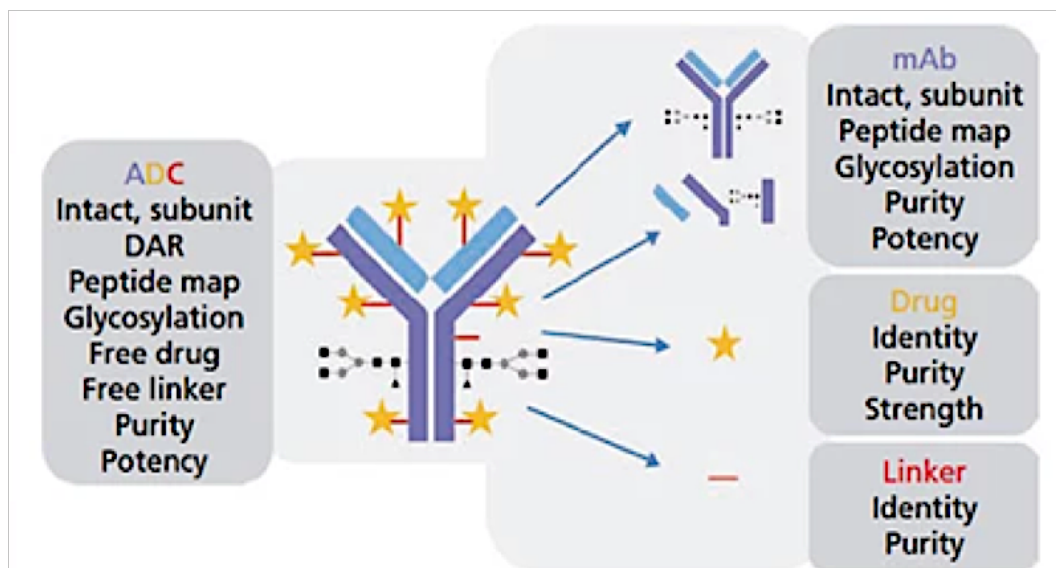
промени во секундарната структура на Ритуксимаб-имуноконјугати

Тестирањето за контрола на квалитет (QC) на ADC треба да даде сметка за неговиот идентитет, чистота, концентрација и активност (потенција или јачина) - исто како и за кој било друг биофармацевтски производ. Заради инхерентната структурна сложеност на mAbs заедно со ковалентно поврзаните цитотоксични агенси, потребни се неколку тестови за QC (Smilkov, K.,2014). Треба да се утврди целосно разбирање на производниот процес и неговиот ефект врз физичко-хемиските и биолошките атрибути на ADC. Меѓутоа, во случај на ADC, дури и добро утврдената терминологија за QC не е јасна - на пример, поимите потенција и сила имаат различни значења во зависност од тоа дали молекулата што се развива е голема или мала. Меѓународната конференција за хармонизација на техничките барања за регистрација на фармацевтски препарати за човечка употреба (ICH) Q6A за мали молекули ја наведува јачината (или анализата) како мерка за количината на активна фармацевтска состојка (API) (11). ICH Q6B за големи молекули го користи терминот потенцијал како квантитативна мерка на биолошката активност. За ADC што ги вклучува и двете од овие компоненти, вкупната функција (или потенцијата) треба да се измери со анализа базирана на клетки што ја проценува целокупната структура, врзувањето со антиген, вчитувањето лекови и испораката на лекот. Конјугација на мали молекули на mAbs, користејќи секаков вид стратегија, има огромен потенцијал да произведе неколку варијантни изоформи. Потребни се соодветни тестови за да се измери хетерогеноста и да се обезбеди конзистентност на производот. Рутинското тестирање и карактеризирање на контролата на квалитет може да измери присуство на агрегати и фрагменти, просечен однос хелаторот и антителото, присуството на неконјугирани mAb, ендотоксини или био оптоварување. Поради хетерогеноста на ADC, изоформите добиени од mAb гликозилација и други пост-преведувачки модификации (PTM) често се контролира точката на ослободување на mAb. Вклучувањето во сертификатната анализа (CoA) за рутинско тестирање на други нечистотии поврзани со производот - како што се агрегати, фрагменти, варијанти на полнеж и неконјугирани антитела-дискутирани погоре, треба да се процени производ по производ. На пример, податоците може да се генерираат за да се покаже дека неконјугираното антитело е соодветно следено и контролирано како дел од ДАР-тестирањето.

2.2.15. Хроматографија на моноклонални антитела, хелаторни агенси,

линери и конјугирани моноклонални антитела

Различни техники на течна хроматографија со ултрависок притисок (UHPLC) се покажаа корисни за анализа на хетерогеноста на ADC на недопрено ниво, вклучувајќи хидрофобна хроматографија на интеракција (HIC), јонска размена хроматографија (IEC), хроматографија за исклучување на големина (SEC) и обратна - фазна хроматографија. Каде што е соодветно, спојувањето на овие техники на раздвојување со точна масовна спектрометрија со висока резолуција (HRAM MS) претставува моќна алатка за карактеризација. Понатамошните детали за структурата може да се утврдат со распаѓање на непроменетиот ADC; обете мапирање на пептиди користејќи хроматографија во обратна фаза и ослободената анализа на гликан со хидрофилна-интеракција хроматографија (HILIC) се сметаат за основни алатки. Секој од овие аналитички пристапи открива различни CQA на ADC-од примарна аминокиселинска секвенца и придружни модификации (мапирање на пептиди) до присуство на агрегирани структури од повисок ред (DIC) што можат да влијаат на еластичноста и безбедноста на производот. Покрај стандардната група на методологии за карактеризација на мали молекули и големи биомолекули, мора да се изврши цела група тестови за да се испита нивото на конјугација на лекот и нивото на неконјугиран mAb, носивост и поврзувач (како што е прикажано на сликата 24 подолу).



Слика 24. Типични пристапи за карактеризација извршени на терапијата ADC.
Typical characterization approaches performed on ADC therapeutics.

2.2.15.1. Течна хроматографија со детекција во ултравиолетовиот регион на спектарот

HPLC-UV е популарна аналитичка техника што се користи за одделување, идентификување и квантифицирање на секоја компонента на дадена мешавина. Позната е и како напредна техника за хроматографија во колона. Растворувачката или мобилната фаза во хроматографијата во течна колона обично тече низ колоната според гравитацијата (Tompkins J., 2017) Во оваа техника, мобилната фаза се движи низ колоната под различни притисоци во зависност од природата на примерокот за тестирање и затоа овој метод е многу побрз од другите хроматографии на колоната. Во оваа техника, пумпите се од голема важност затоа што им овозможуваат на мобилните фази заедно со примерокот да влезат во колона исполнета со цврст материјал, позната како стационарна фаза. Интеракцијата на секоја компонента од примерокот ќе биде различна со мобилната или стационарната фаза и ова овозможува разлика во брзината на проток на секоја компонента, што доведува до нивно одделување. Хроматографија со исклучок на големина или хроматографија за гел- филтрација е една од методите за раздвојување на HPLC. Колоната што се користи е исполнета со материјал кој содржи многу пори. Кога растворени молекули со различна големина влегуваат во колоната, помалите растворени молекули поминуваат побавно низ колоната затоа што продираат длабоко во порите, додека големите растворени молекули брзо минуваат низ колоната бидејќи не влегуваат во порите. Затоа, поголемите молекули се елутираат од колоната порано, а помалите молекули подоцна, што ефикасно ги сортира молекулите според големината. Ова е принципот на одделување на хроматографијата со исклучување на големината. Разни типови колони се достапни, исполнети со абсорбенти со различна големина на молекули и природата на нивната структура (Bond MD., 2010).

Постојат два основни типа на хроматографија со исклучок на големината. Една од нив е хроматографија со гел-пермеација (GPC), која користи хидрофобен материјал за пакување во колона и не-водна подвижна фаза (органски растворувач) за мерење на дистрибуцијата на молекуларната тежина на синтетичките полимери. Второто е гел-филтрациона хроматографија (GFC), која користи хидрофилен материјал за пакување и водена подвижна фаза за одвојување, фракционирање или мерење на молекуларната дистрибуција на молекули растворливи во вода, како што се полисахариди и протеини. Изборот на стационарна и подвижна фаза игра важна улога во процесот на раздвојување на примерокот.

Основните мобилни фази што се користат вклучуваат каква било мешавина од

вода со различни растворувачи, сепак некои системи HPLC се користат без водени подвижни фази составени од малку киселина или сол за да помогнат во раздвојувањето на компонентата на примерокот. Во хроматографијата се користат различни детектори: јонизација на пламен, масен спектрометар, топлинска спроводливост, но најчесто се користи УВ детектор. Овој детектор ја користи способноста на мелекулата да апсорбира светлина во ултравиолетовиот дел од спектарот. Со поминување на УВ-светлина низ одделните компоненти испуштени од смесата со примерокот и мерење на количината на УВ-светлина апсорбирана од секоја компонента, може да се одреди количината на секоја компонента на смесата. Детекторот може да користи една или повеќе бранови должини (Ferreira I., 2001).

Во областа на тестирање на лекови, во областа на фармацијата, биологијата и медицината, HPLC често се користи како аналитичка алатка за тестирање на разни примероци за присуство или отсуство на познати соединенија (метаболити на лекови, лекови, токсини, аминокиселини, пептиди, протеини, моноклонални антитела) и можат да помогнат во идентификување на непознати соединенија. Во фармацевтската хемија, методот HPLC се користи рутински за да се следат хемиските реакции и да се утврди чистотата на лековите. Исто така, може да се модифицира во подготвителен HPLC, кој се користи за изолирање на одредена супстанција во примерок во голема мера. Затоа, главната цел на подготвителната хроматографија е прочистување на одредена материја од интерес за понатамошна употреба (Chhetri HP., 2014)

2.3. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ВО ПРЕДВИДУВАЊЕ НА ФАРМАКОКИНЕТИКА НА ЛЕКОВИ

2.3.1. Улогата на анималните модели во транслациона медицина

Општата цел на биомедицинските истражувања е развој на можни лекови за болести. Тековниот развој на лекови е хендикепиран од високите стапки на расипување; многу молекули кои ветуваа за време на претклинички развој, не успеваат во текот на последователното клиничко тестирање (Di Carlo, F.J., 1992). Дел од опаѓањето може да се должи на ниските стапки на успех на транслација од животно на човек; таканаречената „преведувачка инсуфициенција“ (Welch, MJ., 1986). Постојат две фундаментални перспективи кои потенцијално ги објаснуваат неуспесите во преводот. Првата главна перспектива е дека концептот на предвидливост од животно на човек е фундаментално погрешен. Оваа перспектива се заснова на набудувањето дека хипотезата дека животните се

предвидливи за луѓето никогаш не била научно тестирана и дека има важни разлики помеѓу видовите кај пр. физиологија, генетика, епигенетика и молекуларна биологија. Историски студии за животни биле спроведени во процедури за одобрување на лекови, кои можеби биле засновани на научно застарени принципи (Saeidnia S., 2015). Покрај тоа, животните и луѓето се сложени системи, што е повеќе од збирот на нивните делови, и затоа се секогаш непредвидливи (Atkins, J.T., 2020). Од оваа перспектива, експериментите врз животни кои се изведуваат за да се информира здравјето на луѓето не се етички прифатливи.

Втората главна перспектива е дека биомедицинските и фармацевтските истражувања напредувале во последните децении, бидејќи експериментите со животни се генерално во можност да ја предвидат состојбата кај луѓето (Egli M., 2018) Во оваа перспектива, неодамнешниот неуспех во преводот може да се објасни со недоволно оптимален експериментален дизајн (Chou TC. 2006) и недостаток на репродуктивност воопшто. Многу од факторите вклучени во субоптималниот дизајн на студии врз животни и добиената пристрасност беа прегледани претходно и сè повеќе ги зема предвид научната заедница (Garattini S., 2017).

И двете перспективи во моментот се промовираат од различни групи научници. Ниту една група рутински не се повикува на вкупниот број на достапни докази за можноста да се претпостави животност од човек. Оваа предвидливост, т.е. стапките на успешност на преводот, може да се одредат квантитативно на различни начини. На пример, истражувачите можат да земат примероци од клинички испитувања од регистарот, да ги земат поддржувачките претклинички податоци и да анализираат до кој степен соодветствуваат податоците. Алтернативно, тие можат да примерат претклинички студии што се релевантни за луѓето и да ги анализираат следните клинички студии. Покрај тоа, истражувачите можат да ги анализираат ефектите од пакет интервенции (на пример, лекови) врз специфични исходи (на пр. Биохемија, физиологија и несакани дејства) кај повеќе видови.

Користејќи експериментални фармакокинетски податоци од животни, може да се направат физиолошки фармакокинетски модели кои даваат посигурни предвидувања. Системот на диференцијални равенки опишува дека ограничениот модел на прокрвеност е решен преку компјутерски програми, на аналоген начин на што се користи со компартменско моделирање.

Со повеќето физиолошки модели, претпоставена е дека врзувањето со лекови е линеарно (не е заситено или зависно од концентрација). Покрај тоа, врзаниот и

слободниот лекот кај двете и во ткивото и во плазмата се во рамнотежа. Клиренс за лекот во црниот дроб се претпоставува дека се јавува само во слободниот лек. На својствен капацитет за метаболизам на лекот (и елиминација) е опишан со терминот CL_{int} (внатрешниот клиренс)

Во некои случаи, податоците за животните може да предвидат дистрибуција на лекови кај луѓето земајќи ги предвид разликите во врзувањето со лекови. Во најголем дел, екстраполации од животни до луѓе или помеѓу видовите се само груби проценки и има многу примери во кои разликите во видовите не се целосно припишувани за врзувањето на лекови и метаболизмот.

2.3.2. Ефект на животински видови врз фармакокинетиката

Видот на животните што се користат како модели во пред-клиничките испитувања за тестирање на потенцијален лек е од големо значење во неговата фармакокинетика. Помалите цицачи, како што се глвците, стаорците и зајациите, често покажуваат побрз метаболизам и елиминација, и затоа полуживотот во овие модели може да биде значително помал отколку кај поголемите цицачи како што е човекот. Начинот на администрација влијае и на фармакокинетиката на лекот и може да варира во зависност од животинскиот вид и различните лекови. Ова е особено важно за да се провери дали тие се фармакокинетски тест за ист лек во различни дозирани форми, т.е. постои поинаков начин на апликација (парентерален, орален, локален).

Видот на истото животно може да влијае на фармакокинетиката. На пример, глвците со имунодефициенција на BALB / c и NUDE може да покажат значително различни концентрации на одредени лекови. Возраста е параметар што може да има големи ефекти врз фармакокинетските студии кај многу видови цицачи.

Клиничката применливост на употребата на фармакокинетика поврзана со возраста кај животински модел и нејзината корелација со фармакокинетиката поврзана со возраста е ограничена. Треба да се напомене дека само возрасни животни треба да се користат за експериментални модели, освен ако не е поинаку побарано и одобрено.

Промените што можат да се појават кај животинските модели при испитување на фармакокинетиката на истиот лек во различни возрасни групи на животни може да се земат како причина за проучување на фармакокинетиката во различни возрасни групи кај луѓето.

Отсуството на разлики поврзани со возраста во животинскиот модел не мора да

значи дека нема клинички значајни разлики во фармакокинетиката на лекови кај различни возрасни лица. Сепак, пред-клиничките испитувања на животински модели остануваат клучна почетна точка за понатамошни клинички испитувања. Предклиничките модели на животни во преведувачкото истражување се од фундаментално значење за разбирање на фармакологија на болести и лекови, но често се ограничени во нивната корисност за робусно дефинирање на ефикасна доза во клиниката.

Анималните модели во фармакокинетичката / фармакодинамичката (PK/PD) проценка на конјугираните антитела ќе послужат важна улога во претклиничките проценки на новите радиофармацевтски производи, оптимизирање на дозирањето за оние кои се клинички одобрени и поставување или потврдување на точки на прекин на чувствителноста. Ова е многу корисно за време на раниот развој на потенцијалните радиофармацевтски производи.

Моделирањето на PK/PD може да го оптимизира дизајнот на клинички испитувања, да ги води дозата и режимот што треба да се тестираат понатаму, да помогне во проценка на доказот за механизмот кај луѓето, да се предвиди ефектот во одредени под-популации и подобро да се предвидат интеракциите.

Општо, концентрациите на лекови се поголеми кај возрасни животни во споредба со младите животни за дадена доза.

Моделот PBPK се користи за проценка на времето-концентрација профили на лекови во плазмата и периферните органи кај луѓе со употреба на физиолошки параметри, суб-клеточни фракции (клетки лизирани и содржина фракционирани врз основа на густината), и параметри поврзани со лекови (неврзана фракција и метаболички и клиренс на транспортни мембрани екстраполирани од ин витро експерименти).

Концентрација-време профили на лекот и метаболитите биле испитани за интравенска администрација на лекови. Кога се неколку видови вклучени, физиолошкиот модел може да го предвиди фармакокинетиката на лекот кај луѓето само кога податоци за животни се достапни.

Промени во лекот-протеин врзување, соодноси на партиција на лекови од ткиво-органи и внатрешен клиренс може да се вметнат во физиолошкиот фармакокинетски модел.

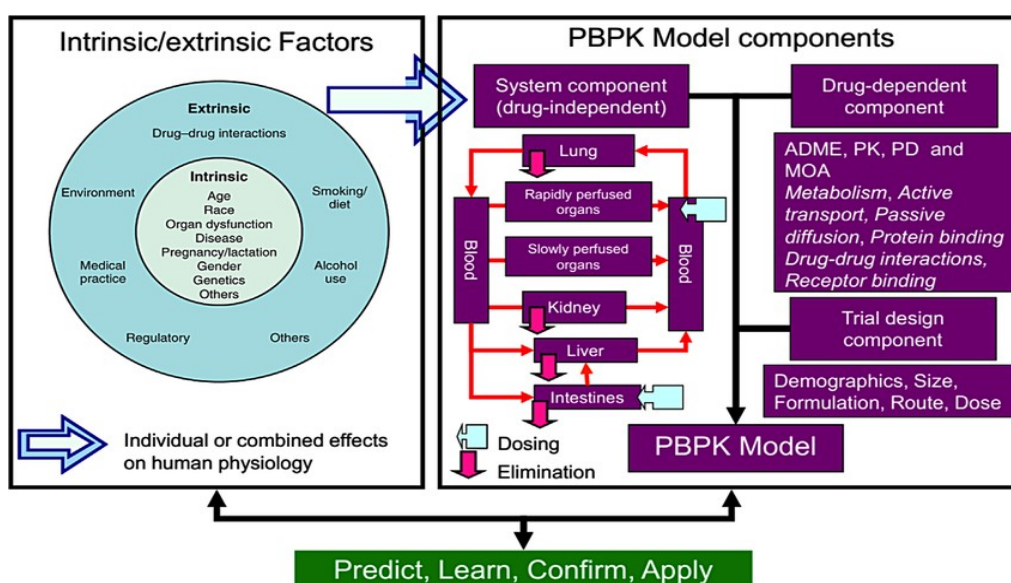
Количината на лекот во организмот не се утврдени директно. Наместо тоа, се собираат примероци од крв во периодични интервали и плазма делот од крвта се анализира за концентрации на лекови во нив. VD се однесува на концентрацијата

на лекот во плазмата (C_p) и количината на лекот во телото (DB), како во следната равенка:

$$DB = V_D \times C_p$$

Преку користење на компјутерски програми може да се развијат и имплементираат добиените резултати добиени од *in vivo* студии врз стаорци.

На ваков начин е можно да се процесира лекот и да се развијат PK параметри користејќи симулација во виртуелен пациент.



Слика 25, Примена на РВРК моделирање и симулација за да се оцени влијанието на различните надворешни и внатрешни фактори врз изложеноста и реакцијата на лекот (Samant TS, The Journal of Clinical Pharmacology, 2015)
Application of PBPK modeling and simulation to evaluate the effect of various extrinsic and intrinsic factors on drug exposure and response.

2.4. КОМПЈУТЕРСКО МОДЕЛИРАЊЕ НА ФАРМАКОКИНЕТИКА

2.4.1. Компјутерски програми во симулација на фармакокинетиката и фармакодинамиката на инјектирани антителиа и нивни конјугати

Во фармацијата, компјутерските програми играат клучна улога во делот на подобрување на целокупниот квалитет на фармацевтското истражување и развој. Разни софтвери помагаат на експериментални дизајни на студии, статистички третман на податоци и разни студии за симулација, итн. Компјутерските програми може да се користат во дизајнирање на нови активни молекули и финални дозирани форми, фармаколошки и токсиколошки студии, во претклиничка симулација за да

се олесни комуникацијата помеѓу моделирање на фармакокинетичките истражувања и донесување на одлуки на одлуки во фармацевтските истражувања. Програмите може да симулираат испорака и транспорт на лекови со помош на:

- (1) шест-одделен физиолошки фармакокинетски модел на проток,
- (2) систем на традиционални модели на простории, или
- (3) систем на диспозиција на лекови со цел ТМДД.

Програмите исто така може да се користат за симулирање на моментална рамнотежа помеѓу концентрацијата и фармакодинамичкиот одговор, или како временски одложувања помеѓу концентрацијата и одговорот. Последното се прави со помош на модели на кругообрт (модели на индиректен одговор). Апсорпцијата, дистрибуцијата и елиминацијата на лекот се претставени со диференцијални равенки, кои се опишани со волумен на органи и ткива или со други количини на дистрибуција, прокрвеност-Q, клиренс и коефициенти на партиција од ткиво во крв. Корисникот може да ги контролира и прилагоди овие параметри со помош на лизгач во реално време. Со интерактивно менување на вредностите на параметрите и симултано прикажување на добиените резултати на концентрација - време и / или време на одговор, корисниците можат да ги разберат главните механизми што управуваат со диспозиција или фармаколошки одговор на лекот во организмот во реално време. Зависноста од распоредот обично се забележува во клиничката пракса со не-линеарна врска концентрација-одговор и е тешко да се комуницира освен преку симулации. Воглавно кај лековите се користени три главни пристапи за анализа на зависноста на концентрацијата од времето. Класичниот пристап вклучува или збир на експоненцијали во облик на емпириски модели, или (II) модели на простори, компартмани. Иако емпиriskите и просторните модели имаат предност во едноставноста и ги задоволуваат потребите на повеќето фармакокинетски студии, тие не опишуваат физиолошки систем со големи разлики во концентрацијата од ткиво во ткиво, ефект на изменета перфузија, отпорност на мембрана или промени во врзувањето на протеините. Ограничувањата на овие класични фармакокинетички модели доведоа до потребата да се има пореален начин на моделирање, имено, (III) модели на физиолошки проток. Општ пристап во физиолошкото моделирање е дефинирање на фармакокинетичките процеси со помош на физиолошки, анатомски и биохемиски значајни параметри. Секој орган е претставен од еден или повеќе компартмани каде секој компартман на васкуларно ткиво е меѓусебно поврзан преку циркулаторниот систем како во телото.

Со цел корисникот да одлучи кој РК софтвер пакет да употреби, важно е корисникот

да знае кој тип на анализа му е потребен. Не сите компјутерски програми ги задоволуваат сите кориснички работни барања. Затоа, изборот на софтвер пакетот ќе зависи од целта на анализата и потребната методологија на РК.

Одлична алатка за претставување во динамично интерактивната презентација на интеракцијата помеѓу физиологијата, фармакологијата и фармакокинетските процеси.

- Лесни за употреба, интуитивна и интерактивна апликација за фармакокинетички и фармакодинамични симулации.
- Параметрите како волумен, клиренс, коефициент на партиција, фармакодинамични параметри, поврзани со режимот на дозирање може да се сменат,
- Овие параметри во реално време се реализираат во промените на времето-концентрација или профили за време-одговор.

2.4.2. Компјутерски програм Maxsim2 – Физиолошки модели на физиолошко базирано фармакокинетичко моделирање – PBPK

Максим користи графички пристап кон учењето на фармакокинетските процеси наместо на традиционалниот начин каде што равенките беа примарен фокус.

Верувањето на Максим е дека ако истовремено може да се види влијанието на промената на одреден параметар (на пример, Клиренс) врз целосниот тек на концентрацијата (и / или специфичните фармакокинетски параметри како што се пикот и преку акумулација, полуживот и AUC) , тој може полесно да ги разбере и запомни фармакокинетските концепти.

Maxsim2 е основниот клинички фармакокинетски и токсикологиски програм дизајниран за различни клинички студии. Овој софтвер има можност да ја пресмета фармакокинетиката, фармакодинамика, токсиколошка студија за животната средина итн. оваа програма е во состојба да симулира испорака на лекови и нивна транспортен систем со помош на:

- Физиолошки фармакокинетски проточен модел на шест компартмански анализи.
- Имплементација во алатка на Tradition compartmental.
- Создавање на таргетирани цели за отстранување на лекот и алатки поврзани со елиминација

Карактеристики:

- Инстантна симулација на екуилибрум на концентрацијата на лекот и други

фармакодинамски одговори.

- Коефициент на партиција на концентрацијата помеѓу ткивото и лекот може лесно да се утврди со употреба на овој софтвер.
- Волуменот на дистрибуција и клиренсот на лекот може да се процени со помош на овој софтвер.
- Обезбедува анализа на симулација во реално време.

Maxsim2 има компартмански модели за симулација на фармакокинетички и фармакодинамични процеси. Maxsim2 е развиен за поддршка на дизајнот на токсикокинетички студии за проценка на безбедноста на нови лекови и затоа е корисна алатка за научници за обезбедување на безбедност при дизајнирањето и користењето на лековите.

Физиолошки заснованиот фармакокинетски модел PBPK користи човечки клинички симулации, модели на стаорец, мачка, куче и коњ се исто така достапни за ветеринарна пракса. Сите параметри на моделот, како што се волуменот на органите V_i , протокот на крв Q_i , коефициентите на партиција K_{Pi} , внатрешниот клиренс CL_{iH} , константите на апсорпција K_a , максималните стапки на метаболизам V_{max} и нивните константи на Мајкалис – Ментен K_m , како и параметрите за дозирање, се достапни за прилагодување во реално време за време на симулациите.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Цел на оваа студија и истражување е воведување и користење на математички софтвер за предвидување на фармакокинетика на еден лек (потенцијален радиофармацевтик), кој содржи конјугирано моноклонално антители кое може да биде обележано со радиоактивен и нерадиоактивен изотоп кај луѓето, а со цел да се предвиди дозата и начин на дозирање врз основа на телесната тежина, а врз база на резултати добиени од предклинички испитувања на модели на животни (стаорец).

Преку истражувањата сакаме да утврдиме дали ваквиот начин на компјутерско моделирање и предвидување може да биде предвидлива алатка за проценка на човечките фармакокинетички параметри и да допринесеме со наши резултати во развојот на транслационата медицина.

1. Како модел за реализација на нашата цел е да ја следиме нормалната фармакокинетиката на ињектирани на моноклонални антители и нивни конјугати (*rituximab*) наменети за обележување со нерадиоактивни изотопи за дијагностика и терапија кај здрави стаорци како дел од предклиничко испитување. Добиените резултати ќе бидат искористени за математичко моделирање на хумана фармакокинетика.
2. Истото математичко моделирање на хумата фармакокинетика ќе биде искористено и со резултатите добиени по инјектирање на обележани (со нерадиоактивни изотопи) конјугати.
3. Воведување на стандардизирана постапка на добивање на конјугираните антители и нивното обележување врз база на постоечките протоколи, како и воведување на постапка за идентификација на конјугираните антители после нивна администрација во анимален метод со помош на хроматографска аналитичка метода – HPLC.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

4.1. Пречистување и коњугација на антитела во користењем разликува BFCA за различна концентрацијска култура

Ритуксимаб беше изолиран со пречистување на комерцијалниот производ MabThera® (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland)) со ултрафилтрација 1 час на 5000 вртежи во минута со уредот Amicon® Ultra-4 (Sigma Aldrich, Missouri, USA), 30 KDa. Антителото беше прочистено со последователно перење во текот на шест циклуси со 0,1 M PBS, pH = 8, со употреба на центрифуга HuMax 4k (Human, Wiesbaden, Germany).

Производот беше реконституиран на 2 ml со 0,1M pH 8,0 фосфатен пуфер и се чуваше на 2-8 ° C температури во конусни центрифугирани цевки со сокол од 15 ml

4.2. Коњугација на антитела

Конјугациите беа извршени со мешање на антитела од 10 mg / ml раствор на BFCA во различни моларни односи (p-SCN-Bn-1B4M-DTPA – 1: 20) на 4 ° C и 18 часа инкубација со нежно тресење.

Имуноконјугатите беа прочистени преку шест циклуси на ултрафилтрација (Amicon® Ultra-4, 30 KDa), елуирајќи со 0,05 M амониум ацетат, pH = 7. Концентрациите на имуноконјугат беа прилагодени на 1 mg / mL со употреба на UV / VIS спектрофотометар Jenway® 6715 (Staffordshire, UK). Смесата потоа се монтираше на орбитален шејкер на 2-8 ° C и се остава да реагира преку ноќ (18 часа) со брзина на тресење од 50 вртежи во минута.

4.3. Пречистување на имуноконјугат

Реакционата смеша се става во 2 ml ултрафилтри Amicon 30kDa и ултра-филтрира на 5000 вртежи во минута во 2-8 ° C за 4 едночасовни циклуси, се мие со 2 ml 0,1M pH 8,0 фосфатски пуфер во секој циклус. После секој циклус, беше утврдена

апсорпцијата на ултрафилтратот на бранова должина од 280nm во спектрофотометар ул-вис и ултрафилтрацијата продолжи сè додека апсорпцијата на ултрафилтратот не беше нула (по 4-тиот циклус). Прочистениот имуноконјугат е вратен од ултрафилтрите со превртување на ултрафилтрите и центрифугирање при 500 вртежи во минута за еден час.

4.4. Одредување на концентрацијата со UV-VIS спектрофотометрија

Прочистениот имуноконјугат е реконституиран во 1 ml со употреба на 0,1 M фосфат пуфер pH 8,0. Од него беше извлечен дел од 0,100 ml, реконституиран на 1 ml со 0,1 M фосфат пуфер pH 8,0 и неговата концентрација се определи со користење на UV-VIS спектрофотометрија на 280nm бранова должина.

4.5. Обележување на конјугати на ритуксимаб со не-радиоактивен итриум и лутетиум

Обележувањето на имуноконјугати со не-радиоактивни изотопи беше извршено по растворање на имуноконјугатите во стерилен раствор на NaCl 0,9%. 1,0 μ L раствор на LuCl_3 со концентрација од 1,0709 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ [еквивалентно на радиоактивност ^{177}Lu од 4377,1 MBq, што одговара на МТД кај пациенти] ќе се додаде во растворениот имуноконјугат. Две шишенца се користеа за хелација, едната вијала за хелација со стабилен лутетиум и другата за хелација со стабилен јатриум. Една од шишенцата е реконституирана со 1ml 0,05M ацетен пуфер pH 7,0 за хелација со стабилен лутетиум. Другата вијала е реконституирана со 1ml 0,05M ацетен пуфер pH 5,5 за хелација со стабилен јатриум. Подготвен е 10 ml раствор на LuCl_3 1,0709mg / ml во 0,05M HCl (раствор А). Исто така, беше подготвен раствор од 100mcl на YCl_3 11,555mg / ml (тоа е 5,7775mg во 50mcl) во 0,05M HCl (раствор Б). Подготвен е 10 ml раствор на EDTA 0,01M во дестилирана вода без метал и неговата pH прилагодена на 6,0 (раствор С).

Додаден е 10mcl раствор А и во една од вијалата што содржи 1mg имуно-конјугат на ритуксимаб-1b4mDTPA реконституиран со 0,05M ацетен пуфер pH 5,5. Реакционата смеса се инкубираше на собна температура 30 мин (Мешавина I). , 61mcl раствор Ц е додаден во мешавина I и се инкубира 15 минути на собна температура. Потоа, смесата се прочисти со миене преку колона 10ml G25 Sephadex со фосфат пуфер pH 8,0 во фракции од 1 ml. Беа собрани фракции со висока концентрација (фракции 4 и 5), а остатокот беше отфрлен. Прочистениот производ се чуваше во стаклени шишенца тип I во фрижидер во очекување на

понатамошна манипулација. Во другото шишенце кое содржи 1mg имуно-конјугат на ритуксимаб-1b4mDTPA реконституиран со 0,05M ацетен пуфер pH 5,5, додаден е 30mcl раствор Б и се меша. Реакционата смеса се инкубираше на собна температура 30 мин (смеса II).

Потоа, 63mcl раствор D е додаден во мешавина II, се меша и се инкубира на собна температура за 15 минути. Потоа, смесата се прочисти со миеење преку колона 10ml G25 Sephadex со фосфат пуфер pH 8,0 во фракции од 1 ml. Беа собрани фракции со висока концентрација (фракции 4 и 5), а остатокот беше отфрлен. Прочистениот производ се чуваше во стаклени шишенца тип I во фрижидер во очекување на понатамошна манипулација.

4.6. Определување на чистота и интегритет на имуноконјугатите ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV

Интегритетот и чистотата на ритуксимаб-имуноконјугат 1B4M-DTPA во кој односот антитела-лиганд беше 1:20, како и можното присуство на производи за деградација, беа утврдени со методот HPLC-UV, користејќи колона Zorbax Bio Series GF-250. Одреден волумен (20uL) антитела во комерцијална форма, прочистено антитело и конјугат на антитела со 1B4M-DTPA лиганд беше нанесен во хроматографската колона, користејќи подвижна фаза од 0,9% NaCl и проток од 1 mL / min. Процесот на елуирање беше следен со УВ детектор со бранова должина од 280 nm.

4.7. Воведување на анимален модел на стаорец

Ин виво испитувањето на кинетиката на конјугираните антитела ќе се врши на стаорец (Wistar) после инјектирање на конјугираните моноклонални антитела и земање на примероци на крв на 1, 3, 24, 48, 72 часа после инјектирање. Како контрола ќе се користи следење на фармакокинетика на нативни моноклонални антитела.

4.8. Експериментален дизајн

Сите експериментални постапки се изведуваат во согласност со Водечките принципи за нега и употреба на лабораториски животни одобрени од Македонскиот центар за биоетика. Сите протоколи се одобрени од страна на Анималниот Етички Комитет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, а во согласност со Интернационалните Водечки принципи за биомедицински истражувања

вклучувајќи животни, издадено од Советот за меѓународни организации на медицински науки (Council for the International Organizations of Medical Sciences).

Користените анестетици се согласно стандардите дадени во Европската Директива 86/609/ЕЕС (EC Directive 86/609/ЕЕС).

Животните кои се користат во сите истражувања во студијата се од видот Wistar на возраст до 6 месеци, женски со маса од 210-300 грама и се чуваат 12:12 дневно: ноќен циклус (светлосно:темен).

Животните се хранат со стандардна храна за стаорци и вода *ad libitum*, на термо-неутрална температура од 22°C. Експериментот трае 72 часа.

Експериментален протокол

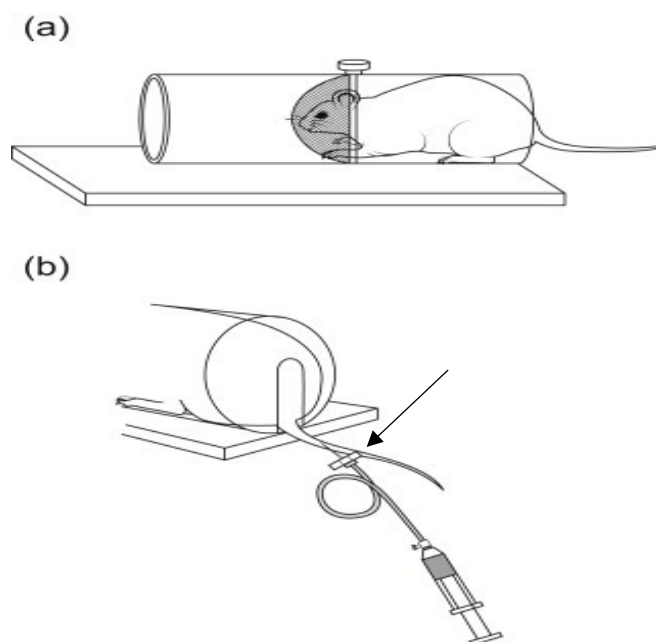
- Првата група на стаорци (3 стаорци) која се реферира како контролна група и за време на експерименталниот протокол беше чувана во стандардни лабораториски услови. На оваа група стаорци беше инјектирано нативно антитело Rituximab (Mabthera), во волумен од 150 ml, со концентрација 1mg/ml. Инјектирањето беше вршено со инсулински шприц и игла во опашна вена на секое животно, претходно затоплена во топла вода на температура од 40°C - 50°C.
- Втората група на стаорци (3 стаорци) која се реферира како група 1 за време на експерименталниот протокол беше чувана во исти стандардни лабораториски услови. На оваа група стаорци беше инјектирано коњугирано антитело Rituximab (Mabthera) со бифункционален хелатирачки агенс 1B4M-DTPA во волумен од 150 ml, со концентрација 1mg/ml. Инјектирањето беше вршено со инсулински шприц и игла во опашна вена на секое животно, претходно затоплена во топла вода на температура од 40°C - 50°C.
- Третата група на стаорци (3 стаорци) која се реферира како група 2 за време на експерименталниот протокол беше чувана во исти стандардни лабораториски услови. На оваа група стаорци беше инјектирано нативно и коњугирано антитело Rituximab (Mabthera) со бифункционален хелатирачки агенс 1B4M-DTPA обележано со нерадиоактивен лутециум согласно стандардната постапка за обележување во волумен од 150 ml, со концентрација 1mg/ml.
- Инјектирањето беше вршено со инсулински шприц и игла во опашна вена на секое животно, претходно затоплена во топла вода на температура од 40°C - 50°C.

За време на период од 72 часа по инјектирањето на препаратите кај сите три групи земани се крвни примероци опашката на секое животно во Eppendorf

полипропиленски епрувети со капаче од 1.5мл.

Земањето на крв согласно протоколот се зема после 1, 3, 24, 48 и 72 часа од инјектирање.

Земената крв во волумен (0.5-0.8мл), еден час по земање се центрифугира на 1500rpm. Добиените серумски примероци одвоени во Eppendorf полипропиленски епрувети со капаче од 1.5мл се замрзнуваат на -80°C за понатамошно испитување.



Слика 26. (а) опашката е слободна за работа. (б) крилна игла се вметнува во страничната опашка вена за да се собере крв.
 (a) Only the tail is free for operation. (b) A winged needle is inserted into the lateral caudal vein to collect blood.

4.9. Определување на интегритетот на имуноконјугатите ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV во примероци на серум од стаорец

Интегритетот на ритуксимаб-имуноконјугат во примероци на серум од стаорец, како и можното присуство на производи за деградација, беа утврдени со методот HPLC-UV, користејќи колона Zorbax Bio Series GF-250 и фосфатен пуфер како елуент.

Одреден волумен (20 (L) антитела во комерцијална форма, прочистено антитело и конјугат на антитела со 1B4M-DTPA лиганд беше нанесен во хроматографската колона, користејќи подвижна фаза од 0,9% NaCl и проток од 1 mL / min. Процесот на елуирање беше следен со UV детектор со бранова должина од 280 nm.

Добиените вредности преку анализа на серум добиена од крвните примероци треба да дадат информација за присуството на имуноконјугатите, утврдување на нивната структура, како и стабилност на истите преку следење на евентуални распадни продукти.

4.10. Интерактивна компјутерска симулација за испитување на фармакокинетиката и фармакодинамиката на инјектираните антитела

Компјутерски програм користен во докторскиот труд е - Maxsim2 – и служи за интерактивна компјутерска симулација за испитување на фармакокинетиката и

фармакодинамиката на инјектираните антитела (Mats Jirstrand, Department of Systems and Data Analysis, Fraunhofer-Chalmers Centre, Gothenburg, Sweden, развиен 2014 година).

Предклинчката симулација ќе се користи за да се олесни комуникацијата помеѓу фармакокинетичко моделирање и постигнување на еквилибриум помеѓу концентрацијата на лекот и фармакодинамскиот одговор

Во оваа студија, ќе користиме физиолошки здрава база за да изградиме фармакокинетски модел за употреба во клинички симулации кај човекот, како и за преклинички (стаорци)

Компјутерската програма, Maxsim2, може да симулира испорака и транспорт на лекови со помош на (I) шест-просторен физиолошки базиран фармакокинетски модел на проток, (II) систем на традиционални просторни модели, или (III) таргетиран лек систем на диспозиција. Maxsim2 исто така може да се користи за симулирање на моментална рамнотежа помеѓу концентрацијата и фармакодинамскиот одговор, или како временски доцнења помеѓу концентрацијата и одговорот.

5. РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО

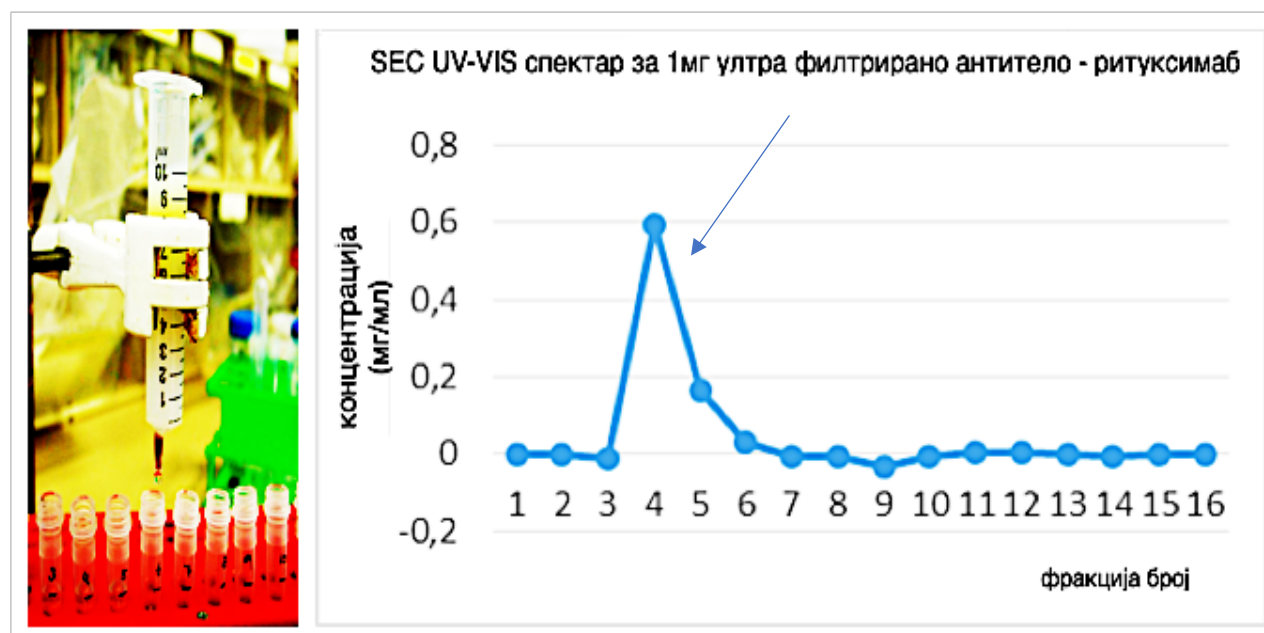
5.1. Прочистување на ритуксимаб од комерцијален производ MabThera®

Ритуксимаб-от кој беше користен во мојот труд е добиен од комерцијалниот производ MabThera®.

Бидејќи овој комерцијален производ беше наменет за апликација кај пациенти, содржеше одредени адитиви и стабилизатор. За реализација на нашите експерименти, ни требаше чисто антитело. Од таа причина, ние го прочистивме комерцијалниот производ користејќи постапка на ултрафилтрација.

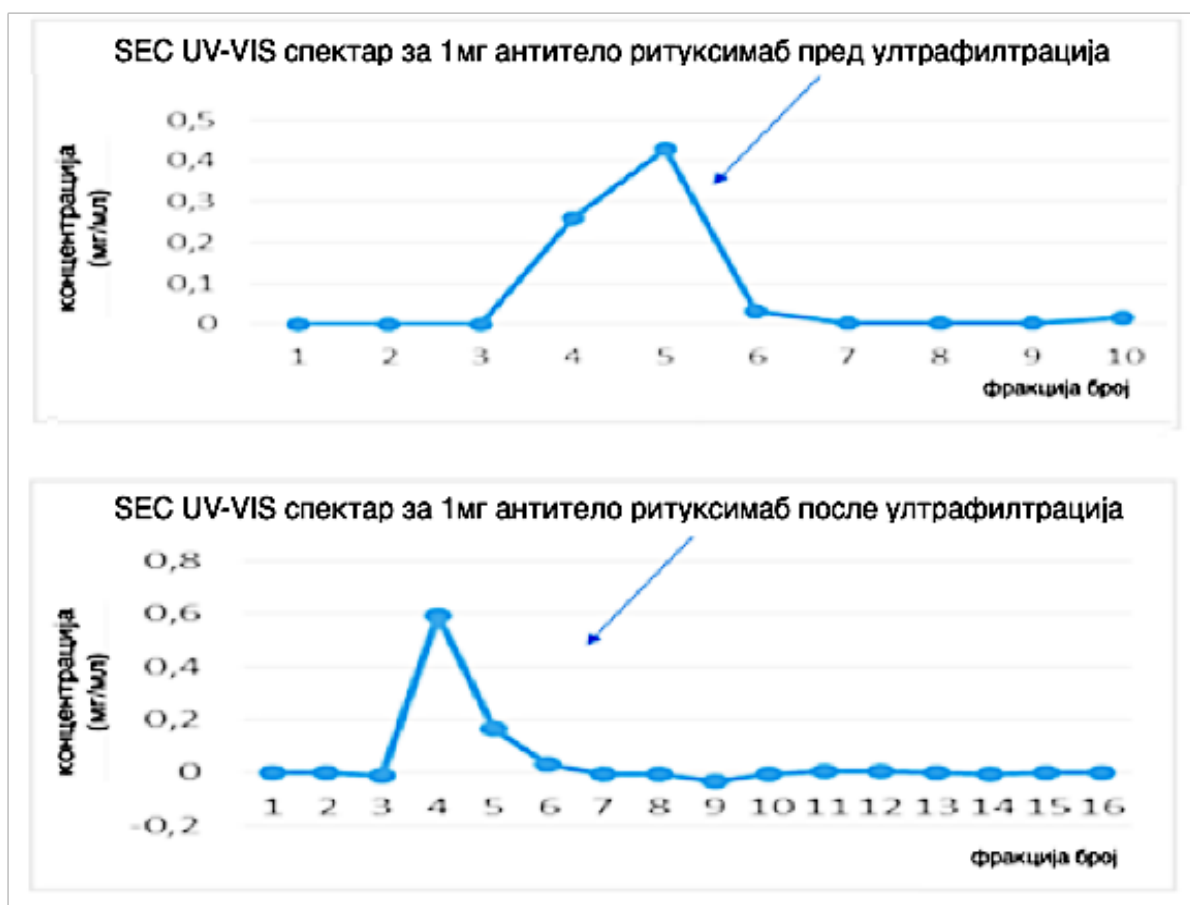
За време на процесот на ултрафилтрација, како што е опишано во методите, сакавме да ги елиминираме сите присутни супстанции, како и евентуални деградациони продукти во облик на фрагменти од антителата добиени за време на самиот процес на ултрафилтрација.

Користевме хроматографија за исклучување на големина (SEC) за да ја потврдиме чистотата и присуството на целиот ритуксимаб, како што е прикажано на сликите 27 и 28 подолу.



Слика 27. Хроматографија за исклучување на големина со откривање на УВ-ВИС за прочистен ритуксимаб

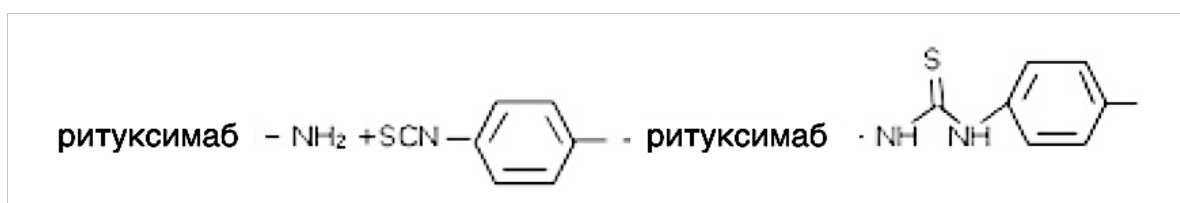
Size exclusion chromatography with UV-VIS detection for purified rituximab



Слика 28. Споредба на спектрите за исклучување на големината на хроматографијата за не-прочистен и прочистен раствор на ритуксимаб.
Comparison of the Size exclusion chromatography spectra for non-purified and purified rituximab solution.

5.2. Конјугација на ритуксимаб со 1B4m-DTPA

Процесот на конјугација, како што е опишан во делот за методите, беше извршен со употреба на лиганд 1B4mDTPA во 0,1M фосфат пуфер pH 8,0 додаден на прочистеното антитело. Односот на антителото и лигандот во мешавината на комплексот ритуксимаб - 1B4mDTPA беше 1:20. Хелаторот во својата структура има 4-изотиоцијанатобензил групи кои учествуваат во процесот на врзување со антителото.



Слика 29. Реакција на коњугација помеѓу ритуксимаб и BFCA
Conjugation reaction between rituximab and BFCA

Врската на тироуреа се формира со реакција помеѓу аминокислотите на лизин од ритуксимаб и изоотиоцијанатните групи на хелатори.

По периодот на инкубација, имуноконјугатната мешавина што содржи ритуксимаб-1B4mDTPA е прочистена.

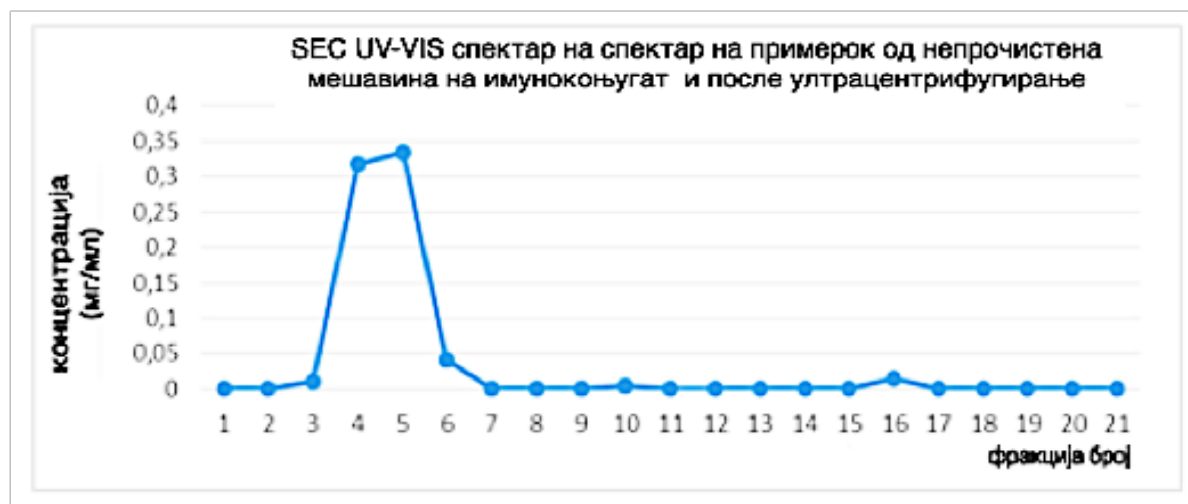
5.3. Прочистување на имуноконјугат

Ние го користевме истиот метод на ултрафилтрација за прочистување на имуноконјугатот како што го користевме за антителото, како погоден метод кој не мора да го оштети антителото.



Слика 30. СЕК спектар на примерок од не-прочистената мешавина на конјугација
SEC spectrum of a sample of the non-purified conjugation mixture

Како што можеме да видиме од Слика 29 погоре, имуноконјугатот ритуксимаб-до-1B4mDTPA е најголемиот од повеќекратните присутни врвови. По прочистувањето, како што е прикажано на Слика 30 подолу, помалите врвови беа елиминирани, покажувајќи ја ефикасноста на процесот на прочистување.



Слика 31. СЕК спектар со откривање на УВ-ВИС за прочистен имуноконјугат.
SEC spectrum with UV-VIS detection for the purified immunoconjugate.

5.4. Одредување на концентрацијата со UV-VIS спектрофотометрија

По прочистувањето, ја утврдивме концентрацијата на прочистениот имуноконјугат како што е опишано во делот за методите погоре. Потоа, најголемиот имуноконјугат беше реконституиран со 0,1 М фосфат пуфер pH 8,0 во 13,7 ml раствор од 1 mg / ml и се чува на 2-8 ° C во соколана центрифуга цевка од 15 ml.

Прочистениот имуноконјугат е искористен за подготовка на радиофармацевтски препарат кој може да биде обележан со радиоактивен и/или нерадиоактивен изотоп.

5.5. Обележување на ритуксимаб - коњугат со нерадиоактивен лутецијум

Обележувањето со не-радиоактивни изотопи и извршено под идентични услови како кога се користат радиоактивни изотопи, а имаше за цел да ја прикаже стабилноста на конјугираното антителио после постапката на коњугација и истовремено да може да се извршат сите хемиски анализи, без ограничување од присутната радиоактивност кои би се наметнале доколку се користат радиоактивни изотопи.

Хемиското однесување на не-радиоактивните и радиоактивните изотопи е идентично, бидејќи се работи за еден ист хемиски елемент, така што ова беше идеален начин да се добијат информации важни за структурата на конјугираните антителиа. После обележувањето и добиениот спектар од хроматографија со исклучување на големината и добиените UV-VIS резултати на нерадио-обележаните имуноконјугати го добивме првиот доказ дека конјугираното антителио е стабилно и може да се користи за обележување на радиоактивни изотопи на итриум и лутециум.

Процесот на коњугација, хелатизација со соодветни лиганди е стресен процес за имуноконјугатот, и секогаш треба да се очекува делумно деградирање на имунокоњугатот. Понекогаш, процесот на хелатизација е доволно стресен за да предизвика значително оштетување, деструкција и дефрагментација на имунокоњугатот и самото антителио. Затоа е потребно да се следи овој критичен процес. Во нашиот случај, ние го испитавме ова со користење на хроматографија со исклучување (SEC- size exclusion chromatography) на примерок од хелат, а со цел да се добие информација за потребата од прочистување пред постапката за обележување (со радиоактивен или не радиоактивен изотоп). Очекуваниот резултат беше е прилажан од SEC - спектарот, прикажан на сликата 32 подолу.



Слика 32. Хроматографија за исклучување на големината за мешавината на хелати со лутетиум
Size exclusion chromatography for the chelation mixture with lutetium

5.6. Одредување на чистота и интегритет на имуноконјугатите на ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV

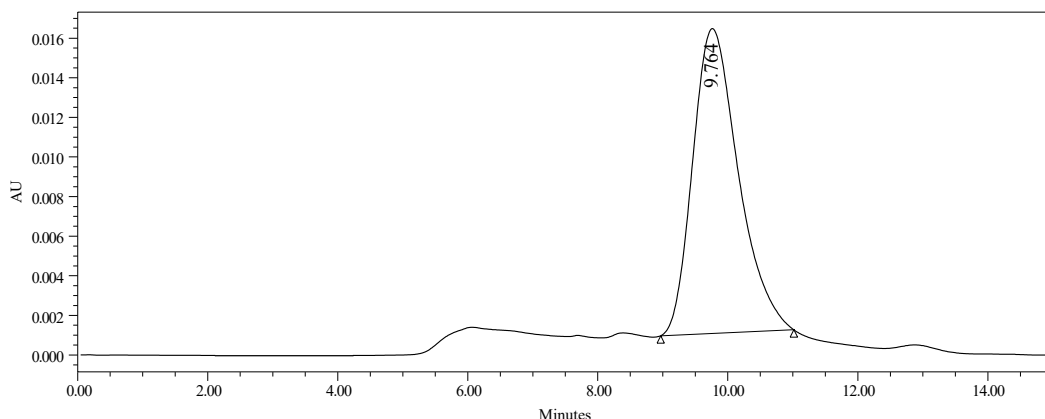
HPLC-UV како метода беше искористена за да се испита интегритетот на имуноконјугатот 1B4M- DTPA во кој односот антитело-лиганд беше 1:20, а сè со цел да се докаже дека конјугатот е стабилен, чист и дека нема производи за деградација во концентрација што би се мешало во биорасположивоста.

Одреден волумен (20 µl) на антитела во комерцијална форма, прочистени антитела и конјугат на антитела со 1B4M-DTPA лиганд беше анализиран со HPLC-UV метод. Хроматограмот од HPLC-UV (слика 33) го прикажува профилот на конјугираното антитело (ритуксимаб- p-SCN-Bn-1B4M-DTPA).

Правилниот избор на техниката за испитување на примерокот за анализа е само еден чекор во развојот на успешна апликација и добивање на соодветни резултати и заедно со методологијата за подготовка на примерокот во форма погодна за испитување е клучна за интерпретација на резултатите без загуба или каква било непланирана измена на примерокот. Сите овие чекори пред-анализа можат да имаат поголем ефект во целокупната точност и веродостојност на резултатите од самото мерење.

Во нашиот случај, а врз база на искуството и публикувани резултати најсоодветна метода, но во исто време и метода која бара најголемо вложување е HPLC со користење на UV детектор.

SAMPLE INFORMATION					
Sample Name:	Ab-konj 1mg+500 cml	PB1.4	Acquired By:	System	
Sample T ype:	Unknown		Sample Set Name	Ab conj Sample 2 1	SS
Vial:	4		Acq. Method Set:	Proteini MS	
Injection #:	1		Processing Method	Ab konj PM	
Injection Volume:	20.00 ul		Channel Name:	W2489 ChA	
Run Time:	15.0 Minutes		Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm	
Date Acquired:	5/12/2021 9:45:05 AM	CEST			
Date Processed:	5/12/2021 2:47:13 PM	CEST			



Слика 33. ХПЛЦ-УВ профил на конјугирано антитело (ритуксимаб- p-SCN-Bn-1B4M-DTPA)

HPLC-UV profile of conjugated antibody (rituximab- p-SCN-Bn-1B4M-DTPA)

Хроматограмот покажува каков вид на примена може да се користи како метод и како може да се види како имуноконјугат е позитивен на кој начин одговара.

5.7. Воведување на анимален модел на стаорец

Воведувањето на анимален модел е втор битен дел во докторскиот труд и кој по своето значење беше многу важен во делот на следење на испитуваниот коњугат. Предклиничките студии на анимални модели сеуште претставуваат критична точка во понатамошниот развој на нови лекови, посебно во развојот на нови радиофармацевтици наменети за терапија.

Во нашата студија како што е објаснето во делот методи сите експериментални постапки се изведуваат во согласност со Водечките принципи за нега и употреба на лабораториски животни одобрени од Македонскиот центар за биоетика. Сите протоколи се одобрени од страна на Анималниот Етички Комитет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, а во согласност со Интернационалните Водечки принципи за биомедицински истражувања вклучувајќи животни, издадено од Советот за меѓународни организации на медицински науки (Council for the International Organizations of Medical Sciences). Користените анестетици се согласно

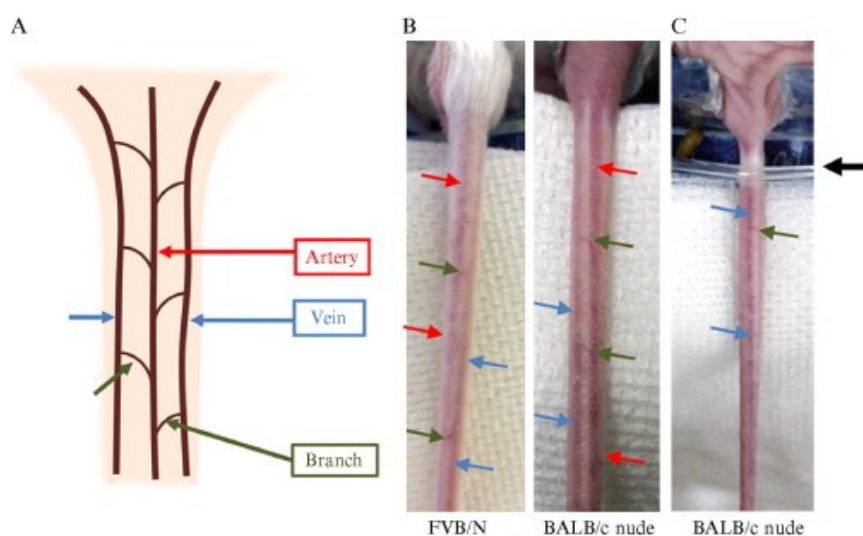
стандардите дадени во Европската Директива 86/609/EEC (EC Directive 86/609/EEC). Апликацијата на нативното антитело, конјугираното и конјугирано обележано со нерадиоактивен лутециум, како и динамиката на земање на крвни примероци од кои беше издвојувана плазма за понатамошни испитувања е прикажана на сликата 34.



Слика 34. Динамика на инјектирање и земање крвни примероци
Dynamics of injection and blood sampling

Работењето и воведување на анимални модели беше паралелен процес во изработката на докторскиот труд, бидејќи и веродостојноста на добиените резултати зависи од начинот на поставување на моделот, начинот на апликација на примероците и земање на крвни примероци.

Доколку третманот на животното (во случај стаорци од видот Wistar) не е согласно протоколот и на правилен начин со користење најчесто на опашната вена (слика 35), посебно при земањето на примероци во одредени временски интервали, можеме да добиеме променлив состав на примерокот за анализа.



Слика 35. Опашни крвни садови на глувчето. (А) Шема на васкулатура на опашката. Садовите на гранките се протегаат од артеријата до вените. Црвени стрели,

артерија; сини стрели, вена; зелени стрели, садови за гранки. (Б) Потребна е внимателна инјекција кај голи глувци BALB / c (*nu / nu*) бидејќи нивните садови се тенки и слаби. (В) Аваскуларизација (црна стрела) или натопување на опашката во топла вода ќе ја олесни инјекцијата. Црвените, сините и зелените стрели се артерии, вени и гранки садови, соодветно.

Tail vessels of the mouse. (A) Scheme of tail vasculature. Branch vessels extend from the artery to the veins. Red arrows, artery; blue arrows, vein; green arrows, branch vessels. (B) Careful injection is necessary in BALB/c nude (*nu/nu*) mice because their vessels are thin and leaky. (C) Avascularization (black arrow) or soaking the tail in warm water will make injection easier. Red, blue, and green arrows are arteries, veins, and branch vessels, respectively.

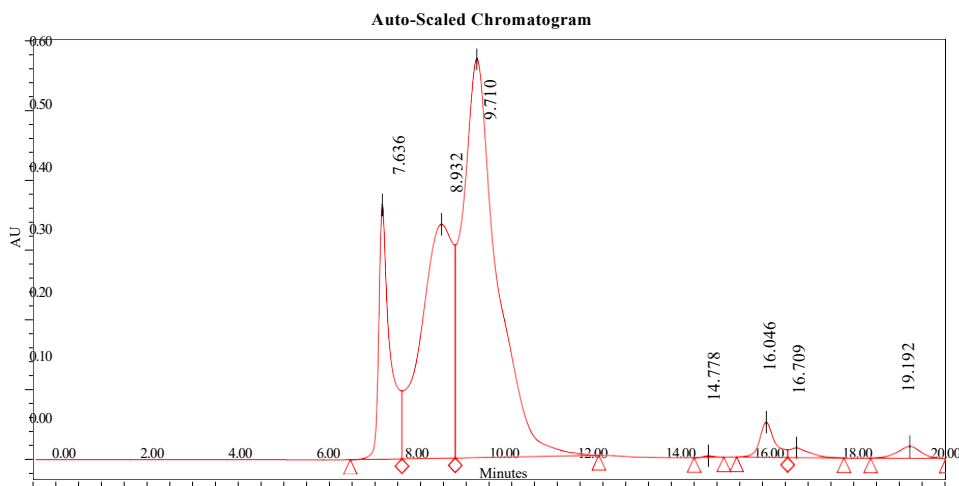
5.8. Определување на интегритетот на имуноконјугатите ритуксимаб и присуство на производи за деградација со употреба на HPLC-UV во примероци на серум од стаорец

Првите тестови беа насочени кон потврдување на избраниот метод, како и да се види дали добиените HPLC профили од серумските примероци ќе можат да ни дадат информации за присуството на конјугати, да ја утврдат нивната структура, како и нивната стабилност со следење на можните производи на распаѓање и на исто време да се користат компјутерски симулации за да се испита фармакокинетиката и фармакодинамиката на инјектираните антитела.

Истата програма се искористи и да ни даде предвидување на хуманата фармакокинетика на конјугирани моноклонални антитела.

Добиените резултати покажуваат дека конјугираното антитело е стабилно и дека постапката за прочистување и конјугација не влијае на неговата стабилност. Хроматограмот добиен од имуноконјугат во серумски стаорец 1 час по инјекцијата (слика 36) јасно покажува присуство на имуноконјугат, но врвовите добиени со време од еден час се показател дека е потребна дополнителна постапка за обработка на примерокот за анализа. Имено, присуството на дополнителни врвови може да биде показател за нечистотиите добиени од серумските протеини.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 2.1 neobraboten	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Ab conj Sample 2 1 SS
Vial:	6	Acq. Method Set:	Proteini MS
Injection #:	1	Processing Method:	Ab conj PM
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	5/12/2021 10:01:04 AM CEST		
Date:	5/12/2021 2:49:46 PM CEST		
Processed:			



Слика 36. HPLC профилен серумски примерок кој содржи конјугирано антитело (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA) 1 час по инјекцијата
HPLC profile serum sample containing conjugated antibody (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA) 1 hour after injection

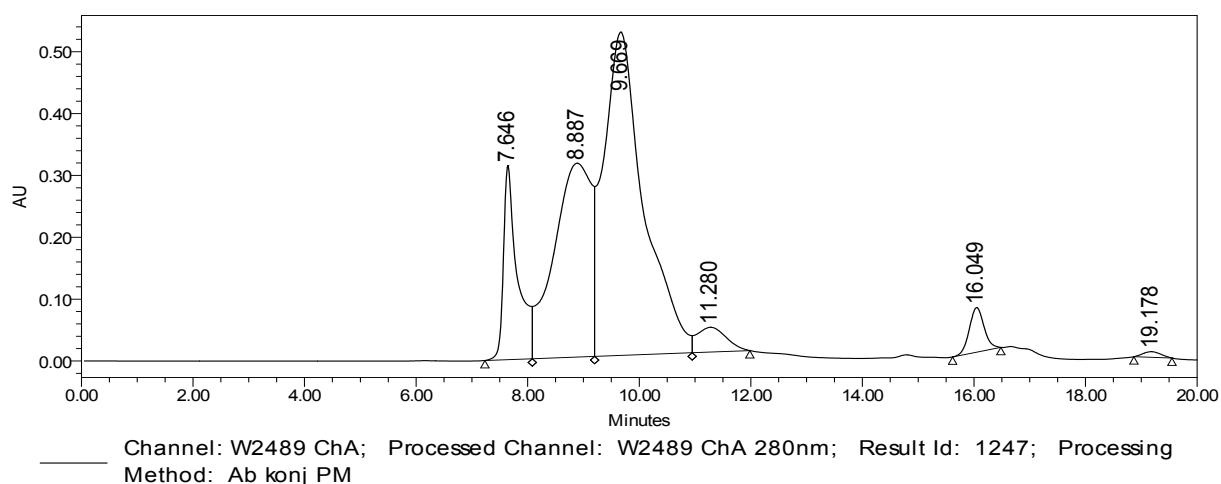
Хроматограмите прикажани на сликата 37, се показател на присуството на имуноконјугатите во серум во различни временски периоди и одговараат на кинетиката кај нормален стаорец.

Директно како такви може да се користат како податоци за следење на фармакокинетиката на имуноконјугатот во различно време и може да бидат од голема важност при воведувањето и стандардизацијата на методот HPLC за определување на конјугирани антитела, што отсекогаш било главно проблем во биолошките препарати и нивните биолошки формулации.

Нивните вредности беа користени како почетни вредности во симулацијата направена со компјутерското моделирање.

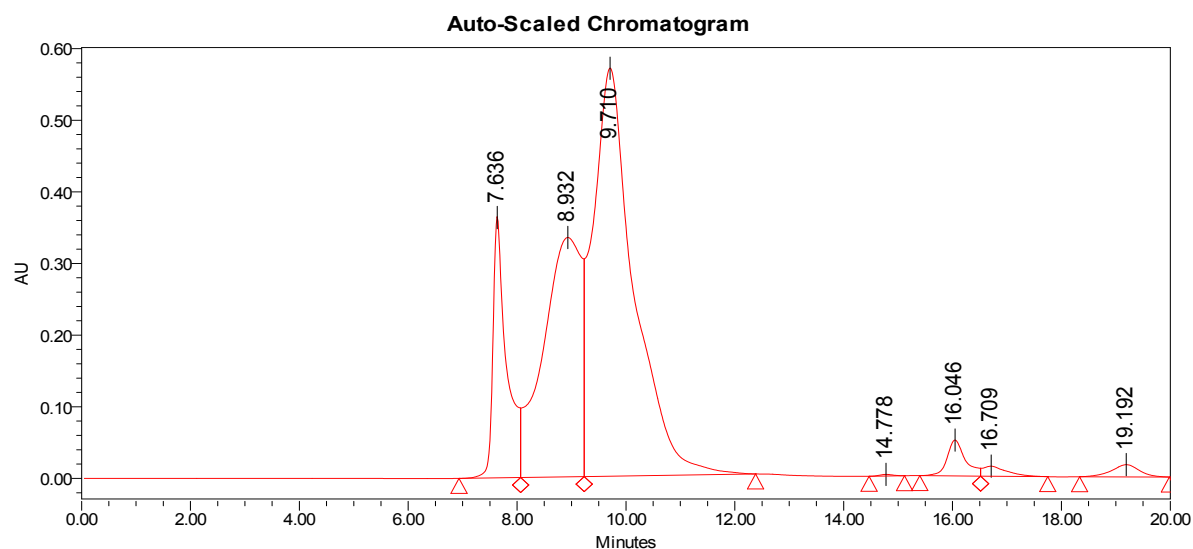
Од хроматограмите во дадените временски интервали можеме да ја видиме кинетиката на конјугираните антитела.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 1.4 protok	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Sample 1 1
Vial:	5	Acq. Method Set:	Proteini MS
Injection #:	1	Processing Method	Ab konj PM
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	5/11/2021 3:27:40 PM CEST		
Date Processed:	5/12/2021 3:13:46 PM CEST		



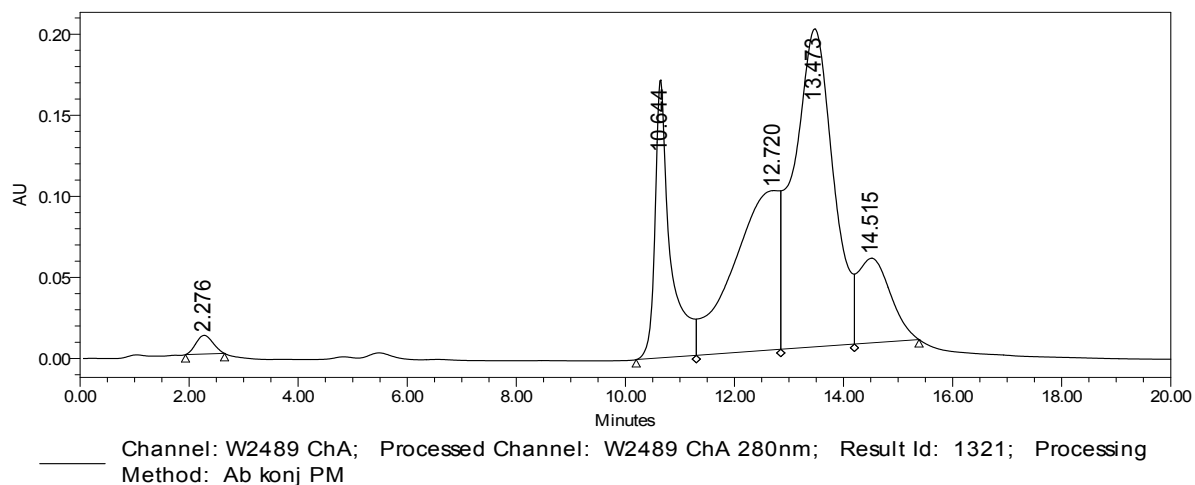
a.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 2.1 neobraboten	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Ab conj Sample 2 1 SS
Vial:	6	Acq. Method Set:	Proteini MS
Injection #:	1	Processing Method	Ab konj PM
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	5/12/2021 10:01:04 AM CEST		
Date Processed:	5/12/2021 2:49:46 PM CEST		



6.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 5.5	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Blood Sample 5 filtrated SS
Vial:	16	Acq. Method Set:	Proteini MS
Injection #:	1	Processing Method:	Ab konj PM
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	7/1/2021 4:17:24 PM CEST		
Date Processed:	7/2/2021 3:44:28 PM CEST		

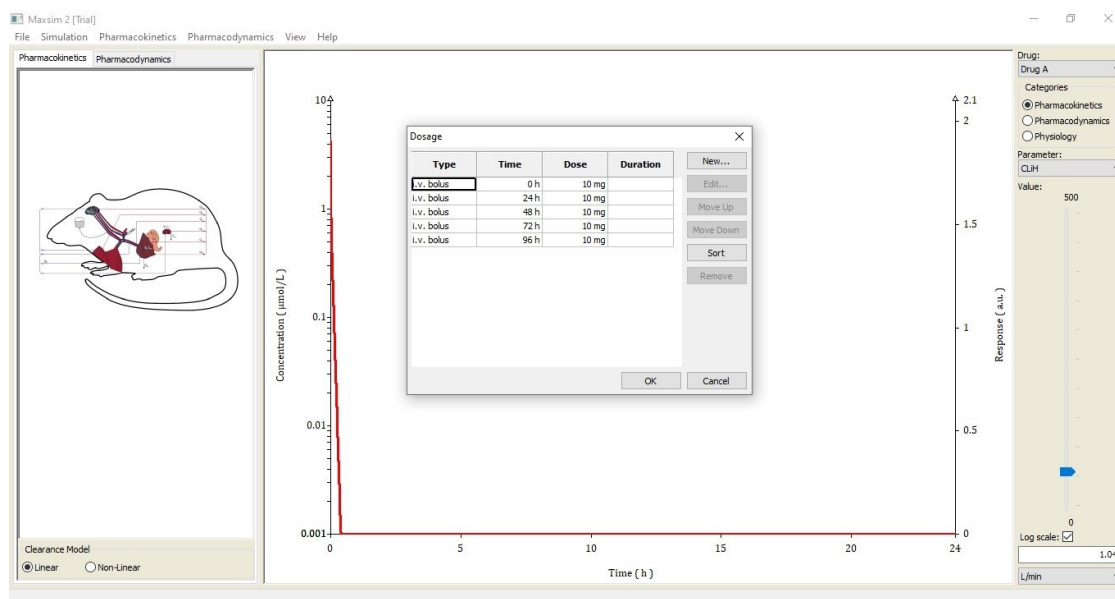


B.

Слика 37. HPLC профилен серумски примерок кој содржи конјугирано антитело (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA) во различни временски периоди по инјекцијата (а – 3 часа, б – 24 часа, в – 72 часа по инјектирање)
HPLC profile serum sample containing conjugated antibody (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA) after different time of injection
(a - 3 hours, b - 24 hours, c - 72 hours after injection)

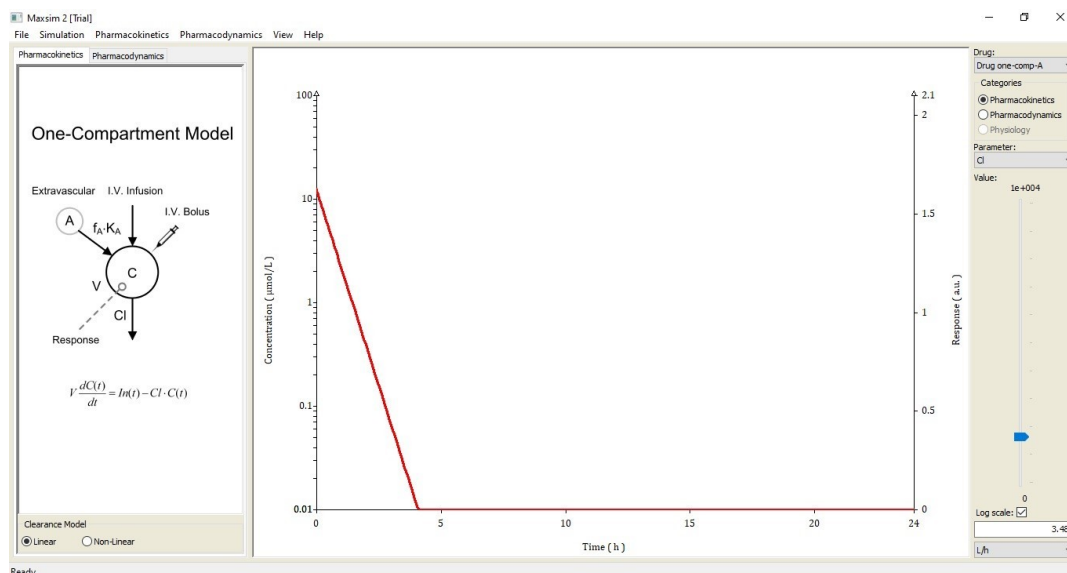
5.9. Физиолошки модели на физиолошко базирано фармакокинетичко моделирање – PBPK со користење на компјутерски програм Maxsim2

Во нашето истражување користевме мултипле IV болус на Вистар стаорец на 1,3, 24,48 и 72 часа по инјектирање на конјугирани антитела и истите обележани со нерадиоактивен лутециум. Резултатите од кои ги изработувавме на ХПЛЦ сме ги имплементирали во софтверот на икона New simulation> Dosage и потоа сме ги изработиле на еднопросторни, двопросторни и физиолошки базирани фармакокинетски модели. Резултатите ќе се илустрираат на сликите подолу:



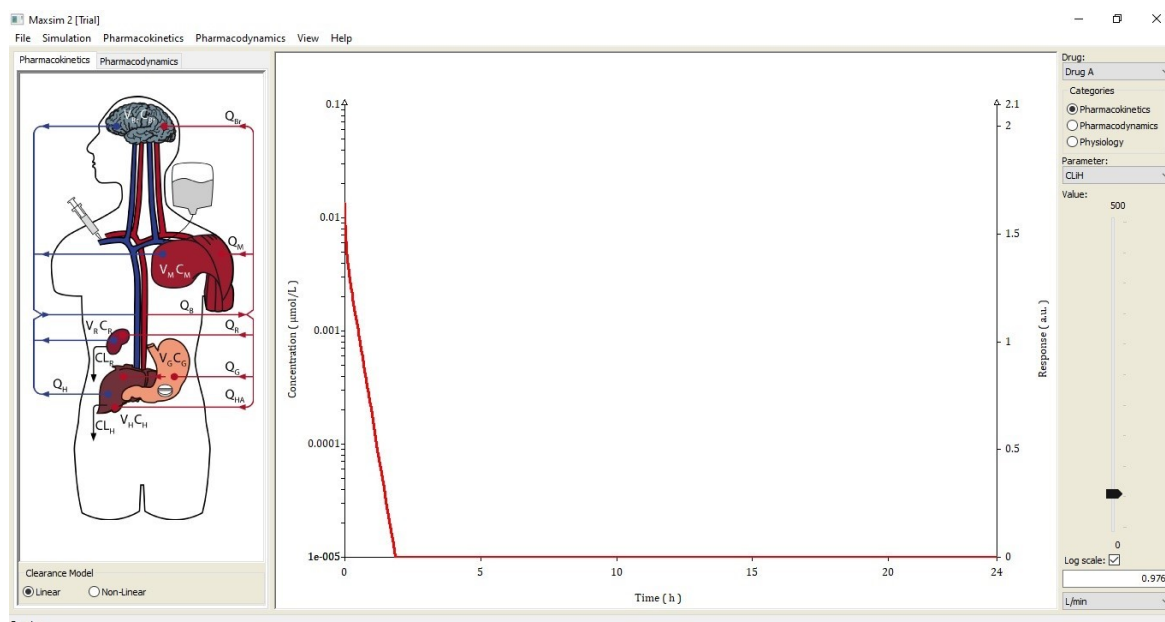
Слика 38. На горниот прозорец гледаме дозирање на симулација, како сме ги одредиле интервалите на боцкање на прочистеното коњугирано антителио MabThera Rituximab 10 мг со Моларна маса 140000 г/мол

In the upper window we see simulation dosing, how we have determined the stinging intervals of the purified conjugated antibody MabThera Rituximab 10 mg with Molar mass 140,000 g / mol



Слика 39. На едно компартмански модел добиваме линеарна опаѓање на АТ со повлекување на параметарскиот лизгач ние ја зголемивме двојно CLiH, за да добијеме подобра симулација на АТ, затоа сто времето за елиминација беше многу спорна.

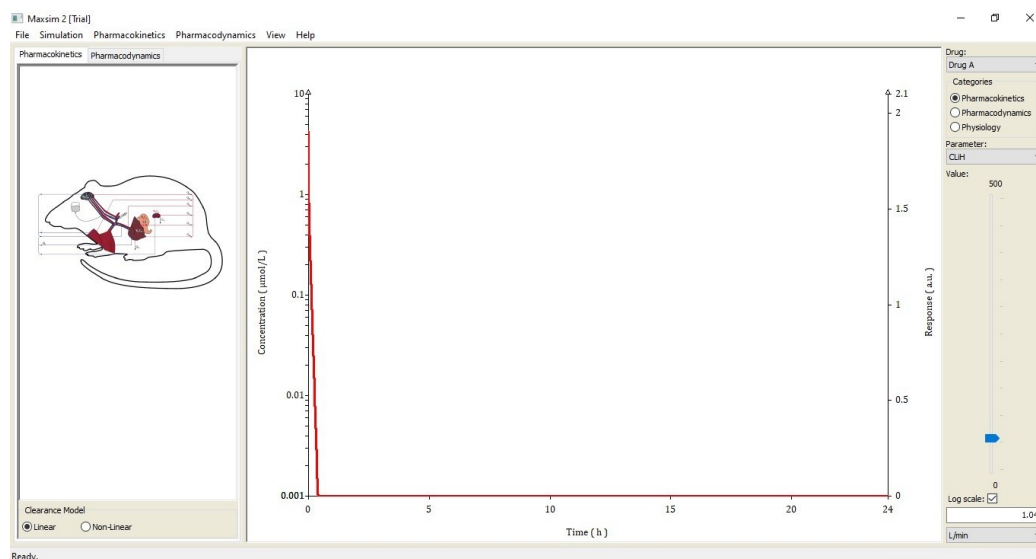
In a one compartment model we get a linear decrease in AT by pulling the parametric slider we doubled the CLiH to get a better simulation of AT, so the elimination time was very controversial.



Слика 40. Физиолошки базирана фармакокинетика (PBPK) користи реален модел на органи за да ја опише кинетиката на лекот. Размената на крвно-ткиво на секој орган се карактеризира со неговиот волумен, перфузија, метаболизам, пропустливост на капиларите и коефициент на поделба на крв/ткиво.

Нашите резултати внесени во Физиолошки базирани фармакокинетски моделирање на човечки модел ни прикажуваат брза елиминација на лекот од двојно зголемување на $CLiH$.

Physiologically based pharmacokinetics (PBPK) uses a realistic organ model to describe the kinetics of a drug. The blood-tissue exchange of each organ is characterized by its volume, perfusion, metabolism, capillary permeability, and blood / tissue division coefficient. Our results entered in Physiologically based pharmacokinetic modeling of the human model show us the rapid elimination of the drug from doubling $CLiH$.



Слика 41. PBPK моделирање на стаорец модел, имаме уште побрза елиминација што е двојно повеќе од човечкиот модел.

PBPK modeling a rat model, we have an even faster elimination that is twice as much as the human model.

Преку Maxsim2 симулација за i.v. болус

- Го одредивме режимот на дозирање во set up прозорот
- Симулиравме фармакокинетичко однесување
- Ги објаснуваме кои се последиците (прикажани со графикони) на текот на концентрацијата-време кога ќе се промените: доза, клиренс или волумен на дистрибуција. Тоа се прави со лизгачот "slider".
- Се објаснува концентрацискиот временски тек во однос на i) C_{max} и C_{min} , ii) AUC и iii) полуживот $t_{1/2}$. Може да се дадат потребните равенки / односи за секоја ситуација.

6. ДИСКУСИЈА

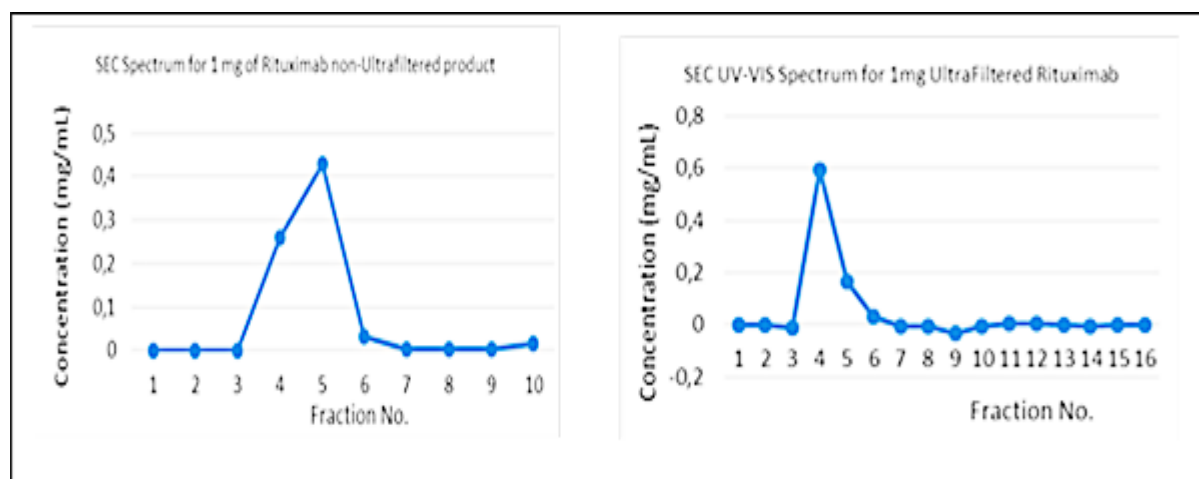
Употребата на туморски моноклонални антители (ТМА) за третман на лимфоми е веќе распространета ширум светот. Постои широк спектар на ТМА кои во моментот се на пазарот или се во истражување за употреба на NHL. Меѓу сите, ритуксимаб продолжува да доминира значително на пазарот. Во споредба со поновата генерација на ТМА за третман на лимфом, ритуксимаб е релативно поевтин и подостапен дури и во земјите сиромашни со ресурси. Исто така, ритуксимаб е химеричен ТМА. Во областа на радиоимунотерапија, сите ТМА кои досега биле регистрирани за употреба кај пациенти со лимфоми се глумци и ги изложуваат третираните пациенти на повеќе несакани реакции и развој на ХАМА. Покрај тоа, студии од ваков вид продолжуваат да привлекуваат огромен интерес од многу истражувачи и информативната база на радиоимунотерапија со користење на имуноконјугати со ритуксимаб продолжува неверојатно. Овие причини и фактот дека ритуксимаб е веќе регистриран во повеќето земји, веќе се користи како додаток со радиоимунотерапија на НХЛ и има утврден профил на ефикасност и безбедност, ја информираше одлуката за употреба на ритуксимаб за оваа студија. Со оптимизиран протокол, радиофармацевтите ќе можат да произведуваат радифармацевтски комплекти ритуксимаб-164м во нивните земји користејќи локално достапни комерцијални препарати за ритуксимаб.

Комерцијалниот производ на ритуксимаб содржи, освен ритуксимаб, ексципиенси како што се tween-80 и цитратски пуфер („MabThera, INN-rituximab - WC500025821.pdf“, н. Г.). Ритуксимаб мораше да се прочисти од овие ексципиенси за да се избегнат какви било потенцијални пречки во сушење на замрзнување, конјугација или хелација. Вообичаените методи за прочистување на антителиа вклучуваат дијализа, филтрација на гел, ултрафилтрација итн. (Liu et al., 2010). Ултрафилтрацијата беше искористена затоа што е лесна за поставување, ефтина, брза, ефикасна и сигурна. Користејќи ги ултрафилтрите милипорни 30kDa, лесните ланци на антителиа и другите молекули помали од 30kDa во комерцијалниот производ на ритуксимаб беа просеани низ ултрафилтрите во ултрафилтратот, бидејќи целиот ТМА на ритуксимаб со поголема молекуларна тежина беше задржан. Сепак, ултрафилтрацијата има можност за зголемување на агрегацијата на протеини (Васкез-Реј и Ланг, 2011), структурни промени и деградација на протеините како резултат на вклучените сили и исто така преку интеракции на

антитела-антитела и / или антитела-мембрана. За да се минимизираат ваквите потенцијални негативни ефекти врз ТМА, се користеше најмал можен број на циклуси на ултрафилтрација. Неопходниот број на циклуси се определи со изведување на пробно прочистување на трговскиот производ ритуксимаб со сериски мерења на концентрацијата на протеини во ултра-филтратот со УВ-ВИС спектрофотометрија на 280nm бранова должина.

Бројот на циклусот по кој концентрацијата на протеинот во ултрафилтратот стана неоткривачка се сметаше за најмалку неопходен и сите други текови за прочистување на ТМА беа извршени со користење на најмалку неопходните циклуси. За да се поврати прочистениот ритуксимаб од ултрафилтерните мембрани, ултрафилтрите беа превртени и центрифугирани. За обновување, се покажа дека е адекватен едночасовен циклус на центрифугација.

На крајот, беше важно да се утврди дали прочистувањето е успешно. Ова беше постигнато со споредување на чистотата на протеините на нечистиот комерцијален производ ритуксимаб и прочистениот производ според нивните спектри СИК. Сликата е како што е прикажано на сликата 39 подолу.



Слика 42. Потврда за ефикасноста на прочистувањето на комерцијалната формулација на ритуксимаб со споредба помеѓу СЕК спектрите на нечистените и прочистените примероци
Confirmation of effectiveness of purification of rituximab commercial formulation by comparison between SEC spectra of non-purified and purified samples

Може да се види дека малите врвови што се припишуваат на 6-та и 10-та фракции беа целосно елиминирани. Било какви помали нечистотии поврзани со такви врвови, успешно се ослободија со ултрафилтрација. Исто така, 5-тата фракција собрана во 4-тата фракција се состоеше од 35% од очекуваниот протеин од 1 мг во примерокот. Спротивно на тоа, прочистениот примерок содржеше скоро 60% од

неговата содржина на протеини како целото антитело (4-та фракција). Врвовите на 5-тата фракција може да се припишат на фрагменти од антитела поголеми отколку што може да се филтрираат низ мембраните за филтрирање на милипорите од 30kDa, како што се фрагментите Fc и F (ab2). Бидејќи 4-тата фракција се очекува да носи некои агрегати на антитела формирани од интеракции на антитела-антитела и антитела-мембрана за време на центрифугирање при 5000 вртежи во минута, значителни количини може да се соберат во 2, 3 и дури 1 фракции.

Тестирањето за агрегати на антитела на бранова должина од 410 nm со UV-VIS спектрофотометрија откри дека 3-тите фракции во двата спектра содржат најголеми количини на агрегати, додека тие не биле откриени во 4-тите фракции. Набудувањето беше во согласност со набудувањата направени од други автори (Katarina S. 2014). Евидентно е од Слика 20 погоре дека процесот на прочистување бил адекватен со оглед на зголемувањето на висината на врвот на повисоката молекуларна тежина придружено со намалување на врвните височини на долната молекуларна тежина. По успешното прочистување, сметавме дека антителото е подготвено за конјугација со бифункционалното средство за хелирање 1b4mDTPA. Прочистувањето на имуноконјугатот е важен чекор за добивање на чист производ за обележување и елиминирање на вишокот на лиганд и оштетено и фрагментирано антитело. Бидејќи користевме моларен сооднос на антитело-хелатор од 1:20, се очекува присуство на вишок хелатор.

Обележувањето беше направено со нерадиоактивен изотоп на LuCl_3 користејќи го протоколот опишан во делот за методите погоре. Целта на ладното обележување е да се користат истите количини на Lu како што се користат во нивните радиоактивни изотопи за испорака на клинички терапевтски радиоактивности (Кам и сор., 2012) .

Како што се гледа од делот за методите погоре, извршивме многу манипулации со антителата, почнувајќи од неговиот одобрен комерцијален производ, па сè до крајните метални хелатни раствори. Од таа причина, сметавме дека е од витално значење да ги испитаме молекуларните структури на сите наши производи и уште поважно, да ги споредиме молекуларните структури на преработените производи со необработените производи на секој чекор.

Воведениот анимален модел беше од критично значење. Ефект на животински видови врз фармакокинетиката

Видот на животните што се користат како модели во пред-клиничките испитувања за тестирање на потенцијален лек е од големо значење во неговата

фармакокинетика.

Помалите цицачи, како што се глувците, стаорците и зајациите, честопати покажуваат побрз метаболизам и елиминација, и затоа полуживотот во овие модели може да биде значително помал отколку кај поголемите цицачи како што се луѓето.

Начинот на администрација влијае и на фармакокинетиката на лекот и може да варира во зависност од животинскиот вид и различните лекови. Ова е особено важно за да се провери дали тие се фармакокинетски тест за ист лек во различни дозирани форми, т.е. постои поинаков начин на апликација (парентерална, орална, локална).

Видот на истото животно може да влијае на фармакокинетиката. На пример, BALB / c и NUDE имунодефициентни глувци може да покажат значително различни концентрации на одредени лекови

Возраста е параметар кој може да има големи ефекти врз фармакокинетските студии кај многу видови цицачи. Сепак, клиничката применливост на употребата на фармакокинетика поврзана со возраста кај животински модел и нејзината корелација со фармакокинетиката поврзана со возраста е ограничена.

Треба да се напомене дека само возрасни животни треба да се користат за експериментални модели, освен ако не е поинаку побарано и одобрено.

Промените што можат да се појават кај животинските модели при испитување на фармакокинетиката на истиот лек во различни возрасни групи на животни може да се земат како причина за проучување на фармакокинетиката во различни возрасни групи кај луѓето. Сепак, отсуството на разлики поврзани со возраста во животинскиот модел не мора да значи дека нема клинички значајни разлики во фармакокинетиката на лекови кај различни возрасни лица.

Општо, концентрациите на лекови се поголеми кај возрасни животни во споредба со младите животни за дадена доза.

Анималните модели во фармакокинетиката / фармакодинамичката (PK/PD) проценка на конјугираните антитела ќе послужат важна улога во претклиничките проценки на новите радиофармацевтски производи, оптимизацијата на дозирањето за оние што се клинички одобрени и поставувањето или потврдувањето на точките на подложност. Ова ќе биде многу корисно за време на раниот развој на потенцијалните радиофармацевтски производи.

Моделирањето на PK/PD може да го оптимизира дизајнот на клинички испитувања, да ги води дозата и режимот што треба да се тестираат понатаму, да помогне во

проценка на доказот за механизмот кај луѓето, да се предвиди ефектот во одредени под-популации и подобро да се предвидат интеракциите.



Слика 43. Интравенска администрација на конјугирани антитела во вената на опашката на стаорец
Intravenous administration of conjugated antibodies in rat tail vein

За клиничка употреба на терапевтски радиофармацевтски лекови засновани на моноклонални антитела, дивимичката и кинетичката стабилност *in vivo* се од витално значење. Оттука, неопходна е дериватизација на терапевтските моноклонални антитела за воведување силни групи на хелатори. Групите на хелатори кои се потенцијално корисни за различни радиоактивни изотопи се веќе синтетизирани и широко проучени.

Ова треба посебно да се испита и објасни кога се користат радиоактивни моноклонални антитела за кои имаме неколку дополнителни критични причини:

- присуството на радиоактивен изотоп со сопствена фармакокинетика може да придонесе за зголемување на зрачењето на органите ако не е добро врзано за антителото кое е специфичен вектор
- антителото што се користи за обележување треба да има високо специфично врзување со целното ткиво и точна претходно испитана фармакокинетика, што не треба да се разликува од тоа кога е радиоактивно
- конјугирани антитела - радиоактивен изотоп (радиоимуноконјугати) во својот состав има различни лиганд-молекули кои овозможуваат ефикасно врзување на изотопот. Овие лиганди можат да ја променат фармакокинетиката на антителата, односно големината и стабилноста на молекулата на антителата.

PK/PD моделирање на однесувањето на секое поединечно користено антитело, неговите радиоимуноконјугати и влијанието на присутните лиганди и сите други

присутни хемиски агенси треба редовно да се изведуваат. Ова е потребно за да се оптимизираат дозите и распоредот на дозирање, да се воведат индивидуално насочен пристап и да се спречи ризикот од неуспех на третманот.

Фармакокинетските студии, особено оние во врска со фармакодинамичките податоци, се важни за поддршка на ефективни и безбедни режими на дозирање, а употребата на модели на животни ги поддржува студиите за клиничка ефикасност и толеранција кај третирани животни.

Моделирањето со PK/PD ни овозможува да разгледаме голем број клучни прашања во различни фази од процесот на откривање и развој на лекот.

Една од клучните цели на преведувачкото, главно механичко, моделирање на PK/PD е да се генерираат априори симулации кои помагаат да се поддржат предвидувањата на перформансите помеѓу различни типови, како што се *in vitro* *in vivo* предвидувања и животинско-клинички корелации. Студиите за животински модел имаат изразена предност во однос на *in vitro* моделите и клиничките испитувања во можноста да се открие кој индекс на дозирање PK / PD е најтесно поврзан со ефикасноста.

Употребата на радиоактивни препарати може значително да го олесни одредувањето на масовната рамнотежа, бидејќи молекулите со радио-обележување можат релативно лесно да се детектираат во примероци од ткиво и телесни течности. Одредувањето на моделот на диспозиција на радиоактивната молекула може да биде адекватно за да се предвидат дозите што треба да се користат во студиите за токсичност резултатите од вкупната изложеност на испитаното животно на супстанцијата (добиеени основни соединенија и метаболити) се загрижувачки. радиообележената молекула не треба да биде биолошки нестабилна; кога радиоактивен елемент е присутен на повеќе од една позиција на испитното соединение, радиоактивноста треба да биде рамномерно распоредена низ молекулата

Радиохемиската чистота на испитната супстанција (радиоактивност која е цврсто врзана за тест соединението, на пр. Антитела) е уште еден важен предвид.

Ако испитуваното соединение содржи радиохемиски нечистотии, т.е. производи за хемиска деградација (на пр. Фрагменти од антитела) кои содржат врзан радиоактивен изотоп и доколку се утврди нивната дистрибуција во органите / ткивата од интерес, заедно со дистрибуцијата на тест соединението, толкувањето е на пример, соединение со 95-99% радиохемиска чистота ќе има различно врзување со целното ткиво (тумор) во споредба со соединение кое има 50%

радиохемиска чистота и 50% различни радиоактивни фрагменти со различна кинетика на однесување.

Сите овие ефекти може да доведат до поефикасен процес на развој. Поради одредени особености на конјугирани антитела, лиганди и особено радиоизотопи, како што се PK/PD, моделирањето на PK/PD може да биде особено релевантно и на тој начин да има важно влијание врз донесувањето одлуки за време на развојот на овие потенцијални радиофармацевтски производи.

Моделирањето на PK/PD при проценка на предвидените примероци од радиофармацевтски производи базирани на моноклонални антитела може да се добијат на ист начин како и другите лекови кај луѓето и тоа со прилагодување на биохемиските параметри во моделите претходно потврдени на животни. Прилагодувањата обично се базираат на експериментални резултати од ин витро тестови врз животни и луѓе и преку замена на соодветна големина кај човечки ткива и проток на крв. Развојот на овие модели секогаш бара компјутерска програма способна истовремено да решава повеќе диференцијални равенки кои одговараат на процесите што се случуваат.

Во докторскиот труд се обидовме да ги покажеме и потенцијалните предности на овој паралелен пристап на моментално спојување или доцнење помеѓу концентрацијата на плазма и фармакодинамскиот одговор, како и релевантноста на користењето на Физиолошки засновани модели на фармакокинетика (PBPK). Физиолошки засновани модели на фармакокинетика (PBPK) се користат за да се опише процесот на дистрибуција на антитело преку конвекција како производ на стапката на проток на лимфата, што претставува хидростатички градиент и термин на ефикасност $(1 - \sigma)$. То σ е коефициент на рефлексija и претставува дел од антителата што се просејува при движење на крвта низ порите и може да има вредност помеѓу 0 и 1. Коефициентите на рефлексija за големи молекули, како mAbs, се претпоставува дека се околу 0,95 во ткивата со континуирана капилари (ткива со тесни крстосници), како што се сврзно ткиво, кожа и мускули. Коефициентот на рефлексija во фенестрирани капилари и синусоиди (црн дроб, слезина и коскена срцевина), кои имаат спукани крстосници, е во опсег од 0,31 и 0,42 .

Конвективно навлегување CL : = Стапка на проток на лимфата \times $(1 - \sigma \text{ ткива})$

$(1 - \sigma \text{ ткива})$ претставува коефициент на рефлексija на ткива

Конвективна елиминација CL : = Стапка на проток на лимфата \times $(1 - \sigma \text{ лимфа})$

$(1 - \sigma \text{ лимфа})$ претставува коефициент на рефлексija на лимфа

За повеќето ткива, дијаметарот на лимфните садови е многу поголем од дијаметарот на парацелуларните пори; како такво σ ткива $\gg \sigma$ лимфа.

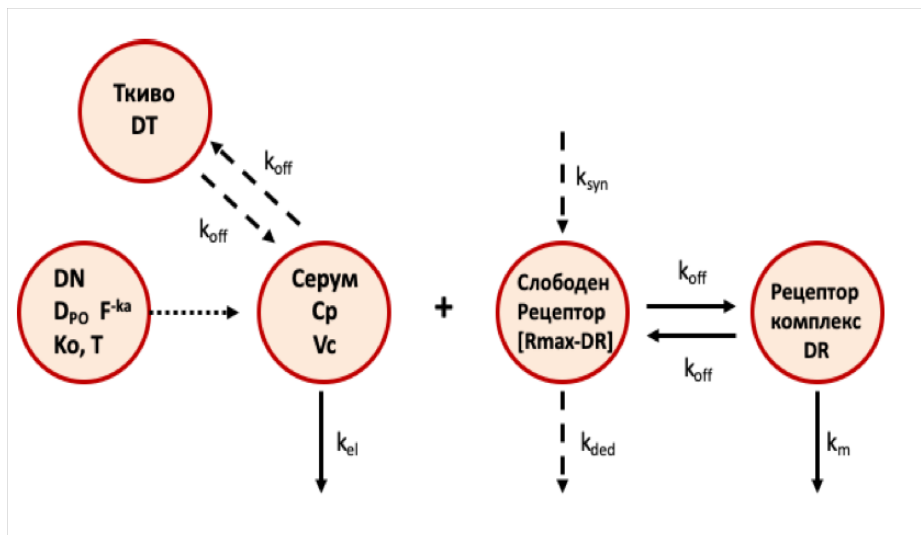
Како последица, **$Cu_ткива,ss \ll Cu_krv,ss$**

Бидејќи работење на специфични биолошки молекули, коњуиграни антители како потенцијални радиофармацевтици, требаше да се земат во предвид и факторите кои влијаат на имуногеноста која требаше да биде задржана после целокупниот третман, прочистување, коњугација и обележување со нерадиоактивни изотопи тоа:

- големина на молекулата
- примарна и терцијарна структура
- структурна сложеност (на пример, гликозилирање)
- дозирање (начин на администрација, времетраење на дозирање)
- потенцијална агрегација на протеини

Познато е дека соединенијата што покажуваат таргет посредувана диспозиција на лек (TMDD) имаат сложена и нелинеарна фармакокинетика, а изборот на режимот на дозирање може да биде голем предизвик бидејќи односот помеѓу дозата, изложеноста на лекот и одговорот повеќе не се интуитивни. За да се оптимизира режимот на ваквото дозирање, важно е да се користат соодветни пристапи за фармакометриско моделирање со цел да се разјасни квантитативната врска помеѓу изложеноста и одговорот на лекот. Во нашата студија се обидовме овој пристап да го искористиме во дискусијата, како составен дел и придонес во разјаснување на ефикасноста на конјуиграните антители кои како радиоактивни треба да се користат за терапија кај пациенти со малигни заболувања. Ова има огромно значење заради фактот што присуството на радиоактивен изотоп кој е носител на деструкцијата на малигното ткиво може да доведе до големи несакани ефекти од радијација, доколку иститот не се дозира соодветно, а во исто време и моноклоналното антитело кое треба да се врзува специфично за целното ткиво, но и за радиоактивниот изотоп преку соодветен лиганд и за кој претставува специфичен носач. Ние се обидовме да го објасниме однесувањето на конјуиграното антитело врзано за изотоп (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA) преку користење на математички модел TMDD за квантитативно да се карактеризира комплексната фармакокинетика и однесувањето на антителото за местото на врзување на целното ткиво (таргет), но и од други механизми и споредиме со резултатите кои ги добивме од анималниот модел и од симулација и користење на компјутерскиот програм. Ова треба да помогне да добиеме подобро разбирање

за нивната целна употреба, но во исто време и начин да се видат и евентуалните недостатоци и да се предложи начин за нивно надолување, посебно заради тоа што се работи за специфични радиофармацевтици за кој вид на истражувања нема доволно публикувани податоци.



Слика 44. Фармакокинетски модел на TMDD кој може да се примени кај препарати базирани на моноклонални антитела користен за обележано конјугирано антитело (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA)
Pharmacokinetic model of TMDD that can be used in monoclonal antibody-based preparations used for labeled conjugate antibody (rituximab-p-SCN-Bn-1B4M-DTPA)

На сликата 44 гледаме фармакокинетски модел на TMDD кој може да се примени кај препарати базирани на моноклонални антитела и кој го користевме за нашиот препарат на обележано конјугирано антитело (rituximab- p-SCN-Bn- 1B4M-DTPA). Препаратот во централниот оддел (Cp, Vc) може да се дистрибуира до неспецифични ткивни места (DT), да се елиминира од системот (k_{el}), или да се поврзе со фармаколошката цел (Rmax-DR) за да се формира комплекс на лекот-цел (DR). Овој комплекс може или да се дисоцира (k_{off}) или да се интернализира и деградира (k_m). Синтезата (k_{syn}) и деградацијата (k_{deg}) на слободните ензими / рецептори исто така се рефлектираат на дијаграмот. Равенките што се користени за карактеризирање на овој комплициран TMDD модел се дадени на следниот начин:


$$\begin{aligned} \frac{dCp}{dt} &= \ln(t) - (k_{el} + k_{pt}) \times Cp + K_{tp} \times \frac{DT}{Vc} \\ &\quad - k_{on} \times R_{max} - DR \times Cp + k_{off} \times DR \\ \frac{dDT}{dt} &= k_{pt} \times Cp \times Vc - k_{tp} \times DT \\ \frac{dDR}{dt} &= k_{on} \times (R_{max} - DR) \times Cp - (k_{off} + k_m) \end{aligned}$$

Втор ред функција на стапка на рецептор-лек асоциација и дисоциација прв ред.

$$\begin{aligned} \frac{dC_p}{dt} &= \ln(t) - (k_{el} + k_{pt}) \times C_p + k_{tp} \times \frac{DT}{V_c} \\ &\quad - k_{off} \times (R_{max} - DR) \times C_p + k_{off} \times DR \\ \frac{dDT}{dt} &= k_{pt} \times C_p \times V_c - k_{tp} \times DT \\ \frac{dDR}{dt} &= k_{on} \times (R_{max} - DR) \times C_p - (k_{off} + k_m) \times DR \end{aligned}$$

Втор ред функција на стапка на рецептор-лек асоциација и дисоциација прв ред.

$$\begin{aligned} \frac{dC_p}{dt} &= \ln(t) - (k_{el} + k_{pt}) \times C_p + k_{tp} \times \frac{DT}{V_c} \\ &\quad - k_{on} \times (R_{max} - DR) \times C_p + k_{off} \times DR \\ \frac{dDT}{dt} &= k_{pt} \times C_p \times V_c - k_{tp} \times DT \\ \frac{dDR}{dt} &= k_{on} \times (R_{max} - DR) \times C_p - (k_{off} + k_m) \times DR \end{aligned}$$


R_{max}: Тоталниот број на местата на врзување (рецептори) дава ограничување на капацитетот
K_m- константа на стапка на прв ред е поврзана со катаболизам на комплексот на антители-рецептор

Стапките на асоциација за врзување на антителата и дисоциацијата честопати се многу побрзи од другите процеси од интерес, а примероците се одделени со време кое го надминува кое е потребно за врзување. Од тие причини, стапката на константа на врзувањето со mAb (на пример, k_{on} и k_{off}) не може да се идентификува во многу случаи. Друг параметар кој влијае и допринесува во специфичноста на лекови базирани на моноклонални антитела е елиминацијата. Човечкиот Fc гама рецептор (Fcγ) врзува IgG (основна структура на моноклоналните антитела) со различен афинитет, и степенот на врзување може да биде мал, среден или многу висок што директно влијае на активноста и елиминација на антителото.

Ефикасноста на TMDD, како маркер за клиренс со е мала кога:

- Комплексната интернализација на рецепторот оди на нула.
- Клиренсот со посредство на TMD станува заситен како што приближува врзувањето на рецепторот до 100%
- Достапноста на таргетот влијае на промената на клиренсот

- високата достапност на таргетот го придвижува клиренсот на TMD кон сатурација со зголемување на концентрацијата на mAb на местото на дејствување
- Потентноста на дозата и најспецифичен афинитет антителото има кога клиренсот со посредство на TMD е мал
- Оптимизација на афинитетот за антителата може да ја подобри потентноста на дадената доза

Голем број на антитела веројатно ќе демонстрираат TMD таму каде што дистрибуцијата и елиминацијата на антитела се под влијание на интеракција на антитела со целниот антиген. На ваков начин може да се очекува диспозицијата на антителата да се поврзе со намалувањето на V_{ss} и CL_d и со зголемување на дозата. По раскинување на комплексот на рецепторите со mAb, може да се очекува TMD да резултира со намалување на CL и со зголемување на дозата.

Заради сето погоре наведено TMD моделот или моделот PBPK се претпочитува во многу случаи, посебно кога се работи за дозирање и предвидување на однесување на комплексни молекули, како што се моноклоналните антитела.

За моделот за интеракција на антителата после IV болус администрација користен во нашите истражувања може да се претпостави:

- моноклоналните антитела (mAb) покажуваат линеарно, биекспоненцијална диспозиција
- mAb и лигандот се врзуваат преку асоцијативна кинетика од втор ред
- нема позитивна или негативна интеракција во врската mAb-лиганд
- комплексот mAb-лиганд демонстрира кинетика на диспозиција, идентична со таа поврзана со неврзано mAb
- комплексот mAb-лиганд е недостапен за елиминација преку патеката (ите) поврзани со елиминација на неврзаниот лиганд (ограничувачко рестриктивно врзување)
- интеракцијата на mAb и лиганд е во рамките на целиот простор на дистрибуција на mAb, и во рамките на дел од дистрибутивниот простор на лиганд

Добиените резултати и вредностите од предклиничка симулација покажаат можни начини како да се олесни комуникацијата помеѓу фармакокинетичко моделирање и постигнување на еквилибриум помеѓу концентрацијата на лекот, во случајот конјугирани и обележани моноклонални антитела и фармакодинамскиот одговор. Истовремено добиените вредности за однесувањето на аплицираниот лек (во

сличајот конјугирани и нативни моноклонални антитела) од анималниот модел, компјутерската симулација на физиолошки модел кај човек и стаорец и споредба со математички модел на ТМДД треба да помогнат и да ја олеснат соодветната апликација на радиоактивно обележаните конјугирани антитела во дијагностика и/или терапија на малигни заболувања.

ЗАКЛУЧОК

Развојот на безбедни и ефективни режими на дозирање е значаен предизвик во развојот на многу нови лекови, особено оние со биолошка структура, како што се моноклонални антитела. Радиофармацевтските препарати како фармацевтски производи по дефиниција го користат истиот метод на тестирање, особено ако нивната специфичност е земена во предвид поради присуството на радиоактивен изотоп и ризикот од негово присуство доколку не се интегрира на стабилен начин.

Ова може да се постигне со интегрирање на информации за компјутер во претклинички експериментални модели. Затоа, точен и предвидлив животински модел заедно со PK/PD моделите може да биде исклучително моќна алатка што може да го води процесот на развој на лекот и да го оптимизира терапевтскиот ефект.

Во овој труд се обидовме да ги претставиме основните фактори кои можат да влијаат на животинскиот модел и студиите на PK/PD на конјугирани моноклонални антитела како потенцијални радиофармацевтски производи и општиот пристап кон дизајнирање на студии за PK/PD.

Убедени сме дека внимателно контролираните студии врз животни ќе продолжат да даваат значителен придонес во развојот на радиофармацевтски производи, особено оние базирани на моноклонални антитела и оптимизација на режимот на дозирање на тие места за терапија.

Добиени резултати ја потврдуваат тезата дека воведувањето на нови препарати е долгорочен процес и дека секој чекор мора да биде научно прилагоден со употреба на најсоодветни аналитички алатки и чувствителни тестови за откривање на мали разлики поврзани со производот помеѓу биосличниот и референтниот производ.

Потврдивме дека методот на прочистување на ултрафилтрација, кој се користеше претходно за слични студии, сепак беше соодветен за прочистување на антителата ритуксимаб од неговите ексципиенси во MabThera без значително оштетување на антителото. Методот на прочистување се препорачува за употреба во слични експерименти.

Структурните разлики и однесувањето на добиените конјугирани антитела се главен индикатор дека употребата на соодветни аналитички техники, како и

нивната правилна валидација и употреба е критичен параметар за нивниот развој и употреба како потенцијални терапевти.

Само валидни податоци добиени преку соодветни аналитички методи може да се користат како податоци во компјутерски програми и да се користат за моделирање.

Техниката HPLC е една од најсоодветните, која обезбедува податоци за однесувањето на конјугираните моноклонални антитела во крвта по нивната администрација и можноста за нивно користење како параметар за улогата на животинските модели во преведувачката медицина.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Kagan L, Turner MR, Balu-Iyer SV, Mager DE. Subcutaneous absorption of monoclonal antibodies: role of dose, site of injection, and injection volume on rituximab pharmacokinetics in rats. *Pharm Res.* 2012; 29(2):490-9.
2. Goldenberg, D.M. and Sharkey, R.M., 2007. Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene*, 26(25), pp.3734-3744.
3. Wang, J., Iyer, S., Fielder, P.J., Davis, J.D. and Deng, R., 2016. Projecting human pharmacokinetics of monoclonal antibodies from nonclinical data: comparative evaluation of prediction approaches in early drug development. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 37(2), pp.51-65.
4. Polli, J.R., Engler, F.A. and Balthasar, J.P., 2019. Physiologically based modeling of the pharmacokinetics of “catch-and-release” anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies in colorectal cancer xenograft mouse models. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(1), pp.674-691.
5. Allen, K.J., Jiao, R., Malo, M.E., Frank, C. and Dadachova, E., 2018. Biodistribution of a radiolabeled antibody in mice as an approach to evaluating antibody pharmacokinetics. *Pharmaceutics*, 10(4), p.262.
6. Sterjova, M. and Janevik-Ivanovska, E., 2019. Anticancer monoclonal antibodies and their radioimmunoconjugates-gateway to the more successful therapy. *Knowledge-International Journal, Scientific Papers*, 30(4), pp.725-731.
7. Ovacik, M. and Lin, K., 2018. Tutorial on monoclonal antibody pharmacokinetics and its considerations in early development. *Clinical and translational science*, 11(6), pp.540-552.
8. Benedetto, R., Massicano, A.V.F., Silva, J.J., Boas, C.A.W.V., Mengatti, J. and Araújo, E.B.D., 2017. Development of radioimmunoconjugate for diagnosis and management of head-and-neck subclinical cancer and colorectal carcinoma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(4).
9. Hu, S. and D'Argenio, D.Z., 2020. Predicting monoclonal antibody pharmacokinetics following subcutaneous administration via whole-body physiologically-based modeling. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 47, pp.385-409.
10. Mwanza Wanjeh, D., Aschalew Alemu, M., Sterjova, M., Arsova-Sarafinovska, Z., Apostolova, P. and Janevik-Ivanovska, E., 2020. Standardization of a method for freeze-drying of antibodies as ready to use therapeutic radiopharmaceutical. *Farmacia*.
11. Van Der Graaf, P.H. and Gabrielsson, J., 2009. Pharmacokinetic– pharmacodynamic reasoning in drug discovery and early development. *Future medicinal chemistry*, 1(8),

- pp.1371-1374.
12. Ait-Oudhia S, Ovacik MA, Mager DE. Systems pharmacology and enhanced pharmacodynamic models for understanding antibody-based drug action and toxicity. *MAbs*. 2017; 9(1):15-28.
 13. Banks, J., 2005. *Discrete event system simulation*. Pearson Education India.
 14. Sokolowski, J.A. and Banks, C.M. eds., 2011. *Principles of modeling and simulation: a multidisciplinary approach*. John Wiley & Sons.
 15. Singh, V.P., 2009. *System modeling and simulation*. New Age International.
 16. Birta, L.G. and Arbez, G., 2013. *Modelling and simulation*. London: Springer.
 17. Thompson, G.A. and Shumaker, R.C., 1989. MLTIDOSE: a multiple-dose simulation program for linear systems characterized by exponential functions. *Drug metabolism reviews*, 21(3), pp.463-469.
 18. Perlin, E., Taylor, R.E. and Peck, C., 1985. Clinical pharmacokinetics: A simplified approach, Part 1. *Journal of the National Medical Association*, 77(6), p.475.
 19. Sterjova, M., Džodić, P., Ruskovska, T., Apostolova, P., Risteski, M. and Janevik-Ivanovska, E., 2019. Preparation and integrity examination of freeze dried kit of trastuzumab-immunoconjugates and cold labeled immunoconjugates by applying SDS-PAGE electrophoresis. *Acta Medica Medianae*, 58(3), pp.15-23.
 20. Levitt, D.G., 2009. PKQuest_Java: free, interactive physiologically based pharmacokinetic software package and tutorial. *BMC research notes*, 2(1), pp.1-6.
 21. Kamath, A.V., 2016. Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies. *Drug Discovery Today: Technologies*, 21, pp.75-83.
 22. Smilkov, K., Gjorgieva Ackova, D., Gjorgoski, I. and Janevik-Ivanovska, E., 2014. Rituximab immunoconjugate kit-formulations for NHL radioimmunotherapy. *Physioacta*, 8(2), pp.113-120.
 23. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol*. 2017; 6: 576-588.
 24. Brocks, D.R., 2015. uSIMPk. An Excel for Windows-based simulation program for instruction of basic pharmacokinetics principles to pharmacy students. *Computer methods and programs in biomedicine*, 120(3), pp.154
 25. Modeling of Antibody-Drug Conjugates. *The AAPS Journal*, 22(5), pp.1-13.
 26. Zou, H., Banerjee, P., Leung, S.S.Y. and Yan, X., 2020. Application of pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in drug delivery: Development and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
 27. Chien, J.Y., Friedrich, S., Heathman, M.A., de Alwis, D.P. and Sinha, V., 2005. Pharmacokinetics/pharmacodynamics and the stages of drug development: role of modeling and simulation. *The AAPS journal*, 7(3), pp.E544-E559

28. Dave, V., Yadav, R.B., Yadav, S., Sharma, S., Sahu, R.K. and Ajayi, A.F., 2018. A critique of computer simulation software's used in pharmacokinetics and pharmacodynamics analysis. *Current clinical pharmacology*, 13(4), pp.216-235.
29. Gabrielsson, J., Andersson, K., Tobin, G., Ingvast-Larsson, C. and Jirstrand, M., 2014. Maxsim2—Real-time interactive simulations for computer-assisted teaching of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Computer methods and programs in biomedicine*, 113(3), pp.815-829.
30. Ward, R.M., Kern, S.E. and Lugo, R.A., 2012. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. In *Avery's Diseases of the Newborn* (pp. 417-428). WB Saunders.
31. Pandey, S., 2010. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 1(2), p.017.
32. Falck, D., Thomann, M., Lechmann, M., Koeleman, C.A., Malik, S., Jany, C., Wuhrer, M. and Reusch, D., 2021, January. Glycoform-resolved pharmacokinetic studies in a rat model employing glycoengineered variants of a therapeutic monoclonal antibody. In *Mabs* (Vol. 13, No. 1, p. 1865596). Taylor & Francis.
33. Kagan, L., Turner, M.R., Balu-Iyer, S.V. and Mager, D.E., 2012. Subcutaneous absorption of monoclonal antibodies: role of dose, site of injection, and injection volume on rituximab pharmacokinetics in rats. *Pharmaceutical research*, 29(2), pp.490-499.
34. Dave, V., Yadav, R.B., Yadav, S., Sharma, S., Sahu, R.K. and Ajayi, A.F., 2018. A critique of computer simulation software's used in pharmacokinetics and pharmacodynamics analysis. *Current clinical pharmacology*, 13(4), pp.216-235.
35. Waldmann, T.A., 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science*, 252(5013), pp.1657-1662.
36. Sterjova, M. and Janevik-Ivanovska, E., 2019. Anticancer monoclonal antibodies and their radioimmunoconjugates-gateway to the more successful therapy. *Knowledge-International Journal, Scientific Papers*, 30(4), pp.725-731.
37. Goldenberg, D.M. and Sharkey, R.M., 2007. Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene*, 26(25), pp.3734-3744.
38. Figueroa, I., Leipold, D., Leong, S., Zheng, B., Triguero-Carrasco, M., Fourie-O'Donohue, A., Kozak, K.R., Xu, K., Schutten, M., Wang, H. and Polson, A.G., 2018, July. Prediction of non-linear pharmacokinetics in humans of an antibody-drug conjugate (ADC) when evaluation of higher doses in animals is limited by tolerability: Case study with an anti-CD33 ADC. In *MAbs* (Vol. 10, No. 5, pp. 738-750). Taylor & Francis.
39. Ait-Oudhia S, Ovacik MA, Mager, D.E. Systems pharmacology and enhanced pharmacodynamic models for understanding antibody-based drug action and toxicity.

In *MAbs* 2017; 9(1): 15-28

40. Singh AP, Shah DK. Application of a PK-PD modeling and simulation-based strategy for clinical translation of antibody-drug conjugates: a case study with trastuzumab emtansine (T-DM1). *The AAPS journal*, 2017; 19(4): 1054-1070.
41. Malik, P., Phipps, C., Edginton, A. and Blay, J., 2017. Pharmacokinetic considerations for antibody-drug conjugates against cancer. *Pharmaceutical research*, 34(12), pp.2579-2595.
42. Ibrahim, A.B., Salem, M.A., Fasih, T.W., Brown, A. and Sakr, T.M., 2018. Radioiodinated doxorubicin as a new tumor imaging model: preparation, biological evaluation, docking and molecular dynamics. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 317(3), pp.1243-1252
43. Kamath, A.V. and Iyer, S., 2015. Preclinical pharmacokinetic considerations for the development of antibody drug conjugates. *Pharmaceutical research*, 32(11), pp.3470-3479.
44. Hedrich, W.D., Fandy, T.E., Ashour, H.M., Wang, H. and Hassan, H.E., 2018. Antibody–drug conjugates: pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling, preclinical characterization, clinical studies, and lessons learned. *Clinical pharmacokinetics*, 57(6), pp.687-703.
45. Rosenbaum, S.E. ed., 2016. *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: An integrated textbook and computer simulations*. John Wiley & Sons.
46. Sager, J.E., Yu, J., Ragueneau-Majlessi, I. and Isoherranen, N., 2015. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: a systematic review of published models, applications, and model verification. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(11), pp.1823-1837.
47. Zhao, J., Cao, Y. and Jusko, W.J., 2015. Across-species scaling of monoclonal antibody pharmacokinetics using a minimal PBPK model. *Pharmaceutical research*, 32(10), pp.3269-3281.
48. Lautz, L.S., Oldenkamp, R., Dorne, J.L. and Ragas, A.M.J., 2019. Physiologically based kinetic models for farm animals: Critical review of published models and future perspectives for their use in chemical risk assessment. *Toxicology in Vitro*, 60, pp.61-70.
49. Nedrow, J.R., Josefsson, A., Park, S., Bäck, T., Hobbs, R.F., Brayton, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A. and Sgouros, G., 2017. Pharmacokinetics, microscale distribution, and dosimetry of alpha-emitter-labeled anti-PD-L1 antibodies in an immune competent transgenic breast cancer model. *EJNMMI research*, 7(1), pp.1-16.
50. Lavezzi, S.M., de Jong, J., Neyens, M., Cramer, P., Demirkan, F., Fraser, G., Bartlett,

- N., Dilhuydy, M.S., Loscertales, J., Avigdor, A. and Rule, S., 2019. Systemic Exposure of Rituximab Increased by Ibrutinib: Pharmacokinetic Results and Modeling Based on the HELIOS Trial. *Pharmaceutical research*, 36(7), pp.1-12.
51. Ait-Oudhia, S., Ovacik, M.A. and Mager, D.E., 2017, January. Systems pharmacology and enhanced pharmacodynamic models for understanding antibody- based drug action and toxicity. In *MABs* (Vol. 9, No. 1, pp. 15-28). Taylor & Francis.
 52. Pilari, S., Gaub, T., Block, M. and Görlitz, L., 2017. Development of physiologically based organ models to evaluate the pharmacokinetics of drugs in the testes and the thyroid gland. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, 6(8), pp.532-542.
 53. El-Masri, H.A., Thomas, R.S., Sabados, G.R., Phillips, J.K., Constan, A.A., Benjamin, S.A., Andersen, M.E., Mehendale, H.M. and Yang, R.S., 1996. Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the toxicologic interaction between carbon tetrachloride and Kepone. *Archives of toxicology*, 70(11), pp.704-713.L.
 54. Reekers, M., Boer, F. and Vuyk, J., 2003. Basic concepts of recirculatory pharmacokinetic modelling. *Advances in Modelling and Clinical Application of Intravenous Anaesthesia*, pp.19-26.
 55. Andersen, S.H., 2014. *Software for in silico testing of an artificial pancreas* (Doctoral dissertation, Master thesis of Engineering Technical University of Denmark).
 56. Madden, J.C., Pawar, G., Cronin, M.T., Webb, S., Tan, Y.M. and Paini, A., 2019. In silico resources to assist in the development and evaluation of physiologically-based kinetic models. *Computational Toxicology*, 11, pp.33-49. Shahzad, A. ed., 2015. *Translational medicine: tools and techniques*. Academic Press.
 57. An, G., Bartels, J. and Vodovotz, Y., 2011. In silico augmentation of the drug development pipeline: examples from the study of acute inflammation. *Drug development research*, 72(2), pp.187-200.
 58. Doke, S.K. and Dhawale, S.C., 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), pp.223-229.
 59. Lin, K. and Tibbitts, J., 2012. Pharmacokinetic considerations for antibody drug conjugates. *Pharmaceutical research*, 29(9), pp.2354-2366.
 60. Di Carlo, F.J. and Oehme, F.W., 1992. *Animal Models In Toxicology*. Edited by Shayne Cox Gad & Christopher P. Chengelis.
 61. Jones, H.M. and Rowland-Yeo, K., 2013. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, 2(8), pp.1-12.
 62. Uhl, P., Fricker, G., Haberkorn, U. and Mier, W., 2015. Radionuclides in drug development. *Drug discovery today*, 20(2), pp.198-208.
 63. European Medicines Agency, 2018. Guideline on the reporting of physiologically based

- pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation.
64. Tozer, T.N. and Rowland, M., 2006. *Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy*. Lippincott Williams & Wilkins.
 65. Onthank, D.C., 2005. *Prediction of "First Dose in Human" for Radiopharmaceuticals/Imaging Agents Based on Allometric Scaling of Pharmacokinetics in Pre-Clinical Animal Models* (Doctoral dissertation, Worcester Polytechnic Institute).
 66. Dammes, N. and Peer, D., 2020. Monoclonal antibody-based molecular imaging strategies and theranostic opportunities. *Theranostics*, 10(2), p.938.
 67. Polakis, P., 2016. Antibody drug conjugates for cancer therapy. *Pharmacological reviews*, 68(1), pp.3-19.
 68. Xue, J., Kong, D., Yao, Y., Yang, L., Yao, Q., Zhu, Y., Ding, Y., Yang, F., Gong, J., Shen, L. and Zhou, T., 2020. Prediction of Human Pharmacokinetics and Clinical Effective Dose of SI-B001, an EGFR/HER3 Bi-specific Monoclonal Antibody. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109(10), pp.3172-3180.
 69. Pierpont, T.M., Limper, C.B. and Richards, K.L., 2018. Past, present, and future of rituximab—the world's first oncology monoclonal antibody therapy. *Frontiers in oncology*, 8, p.163.
 70. Welch, M.J. and Otsuka, F.L., 1986. Animal models for the evaluation of labeled monoclonal antibodies. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 13(6), p.657.
 71. Sterjova, M., Dzodic, P., Makreski, P., Zivkovic, J. and Janevik-Ivanovska, E., 2019. Electrophoresis and Raman spectroscopy characterization of integrity and secondary structure of p-SCN-Bn-DTPA-and p-SCN-Bn-1B4M-DTPA-conjugated trastuzumab. *Farmacia*, 67(4).
 72. Singh, A.P. and Shah, D.K., 2017. Application of a PK-PD modeling and simulation-based strategy for clinical translation of antibody-drug conjugates: a case study with trastuzumab emtansine (T-DM1). *The AAPS journal*, 19(4), pp.1054-1070.
 73. Mou, S., Huang, Y. and Rosenbaum, A.I., 2018. ADME considerations and bioanalytical strategies for pharmacokinetic assessments of antibody-drug conjugates. *Antibodies*, 7(4), p.41.
 74. Morgan, P., 2001, August. The use of preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic data to predict clinical doses: current and future perspectives. In *International Congress Series* (Vol. 1220, pp. 1-12). Elsevier.
 75. Martin, I.J., Hill, S.E., Baker, J.A., Deshmukh, S.V. and Mulrooney, E.F., 2016. A pharmacokinetic modeling approach to predict the contribution of active metabolites to

- human efficacious dose. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(8), pp.1435-1440.
76. White, R., 2015. A Physiologically-Based Pharmacokinetic Model for Vancomycin.
 77. Bumbaca, B., Li, Z. and Shah, D.K., 2019. Pharmacokinetics of protein and peptide conjugates. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 34(1), pp.42-54.
 78. Jennings, M., Marcu, L.G. and Bezak, E., 2015. PET-specific parameters and radiotracers in theoretical tumour modelling. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2015.
 79. Singh, S., Tank, N.K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P. and Chugh, V.K., 2018. Monoclonal antibodies: a review. *Current clinical pharmacology*, 13(2), pp.85-99.
 80. Buist, H.E., 2010. Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment.
 81. Eissing, T., Kuepfer, L., Becker, C., Block, M., Coboeken, K., Gaub, T., Goerlitz, L., Jaeger, J., Loosen, R., Ludewig, B. and Meyer, M., 2011. A computational systems biology software platform for multiscale modeling and simulation: integrating whole-body physiology, disease biology, and molecular reaction networks. *Frontiers in physiology*, 2, p.4.
 82. Sterjova, M. and Janevik-Ivanovska, E., 2017. Моноклонални антитела како анти-канцер терапија. *Farmaceutski informator*.
 83. Datta-Mannan, A., 2019. Mechanisms influencing the pharmacokinetics and disposition of monoclonal antibodies and peptides. *Drug Metabolism and Disposition*, 47(10), pp.1100-1110.
 84. Figueroa, I., Leipold, D., Leong, S., Zheng, B., Triguero-Carrasco, M., Fourie-O'Donohue, A., Kozak, K.R., Xu, K., Schutten, M., Wang, H. and Polson, A.G., 2018, July. Prediction of non-linear pharmacokinetics in humans of an antibody-drug conjugate (ADC) when evaluation of higher doses in animals is limited by tolerability: Case study with an anti-CD33 ADC. In *MAbs* (Vol. 10, No. 5, pp. 738-750). Taylor & Francis.
 85. Wang, L., Ji, S., Li, M. and Cheng, Z., 2016. A novel pharmacokinetic model based on the complex elimination of monoclonal antibodies for bevacizumab pharmacokinetic study in rabbits. *International immunopharmacology*, 31, pp.39-44.
 86. Yadav, D.B., Sharma, V.K., Boswell, C.A., Hotzel, I., Tesar, D., Shang, Y., Ying, Y., Fischer, S.K., Grogan, J.L., Chiang, E.Y. and Urban, K., 2015. Evaluating the use of antibody variable region (Fv) charge as a risk assessment tool for predicting typical cynomolgus monkey pharmacokinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), pp.29732-29741.
 87. Chetty, M., Li, L., Rose, R., Machavaram, K., Jamei, M., Rostami-Hodjegan, A. and Gardner, I., 2015. Prediction of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy

- of a monoclonal antibody, using a physiologically based pharmacokinetic FcRn model. *Frontiers in immunology*, 5, p.670.
88. Darwich, A.S., Ogungbenro, K., Hatley, O.J. and Rostami-Hodjegan, A., 2017. Role of pharmacokinetic modeling and simulation in precision dosing of anticancer drugs. *Transl Cancer Res*, 6(S10), pp.S1512-S1529.
 89. Hof, F. and Bridge, L.J., 2020. Exact solutions and equi-dosing regimen regions for multi-dose pharmacokinetics models with transit compartments. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, pp.1-33.
 90. Smilkov, K., Gjorgieva Ackova, D., Gjorgoski, I. and Janevik-Ivanovska, E., 2014. Rituximab-immunoconjugate kit formulations for NHL radioimmunotherapy. *Physioacta*, 8(2), pp.113-120.
 91. Hosseini, I., Gajjala, A., Yadav, D.B., Sukumaran, S., Ramanujan, S., Paxson, R. and Gadkar, K., 2018. gPKPDSim: a SimBiology®-based GUI application for PKPD modeling in drug development. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 45(2), pp.259-275.
 92. Peters, S.A., 2012. *Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulations: principles, methods, and applications in the pharmaceutical industry*. John Wiley & Sons.
 93. Li, C., Zhang, C., Deng, R., Leipold, D., Li, D., Latifi, B., Gao, Y., Zhang, C., Li, Z., Miles, D. and Chen, S.C., 2019. Prediction of Human Pharmacokinetics of Antibody– Drug Conjugates From Nonclinical Data. *Clinical and translational science*, 12(5), pp.534-544.
 94. Zhao, P., Zhang, L., Grillo, J.A., Liu, Q., Bullock, J.M., Moon, Y.J., Song, P., Brar, S.S., Madabushi, R., Wu, T.C. and Booth, B.P., 2011. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(2), pp.259-267.
 95. Waldmann, T.A., 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science*, 252(5013), pp.1657-1662.
 96. Janevik-Ivanovska, E., Gjorgieva Ackova, D., Smilkov, K., Gjorgoski, I., Stafilov, T., Makreski, P., Arsova-Sarafinovska, Z., Baloch, L., Carollo, A., Signore, A. and Duatti, A., 2016. Development and standardization of Rituximab-conjugates for labeling with Lutetium-177 and Yttrium-90. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 62(Supp), pp.537-538.
 97. Shargel, L., Wu-Pong, S. and Yu, A.B., 2007. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. McGraw-hill.
 98. Rowland, M. Tozer, T.N., 2005. *Clinical pharmacokinetics/pharmacodynamics*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. AIMM 17, 96–101.

99. Approval Letter - Ibritumomab Tiuxetan, (Zevalin), IDEC Pharmaceuticals Corucm113489.pdf[WWW Document], n.d. URL <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm113489.pdf> (accessed 3.3.17).
100. Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* 1767, 1073–1101.
101. Bhangoo, M.S., Karnani, D.R., Hein, P.N., Giap, H., Knowles, H., Issa, C., Steuterman, S., Pockros, P., Frenette, C., 2015. Radioembolization with Yttrium- 90 microspheres for patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* 6, 469–478.
102. Boross, P., Leusen, J.H.W., 2012. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.* 2, 676–690.
103. Brechbiel, M.W., 2008. Bifunctional Chelates for Metal Nuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* 52, 166–173.
104. Carpenter, J.F., Chang, B.S., Garzon-Rodriguez, W., Randolph, T.W., 2002. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice 109–133.
105. Chouvinc, P., Vessot, S., Andrieu, J., 2006. Experimental Study of the Impact of Annealing on Ice Structure and Mass Transfer Parameters during Freeze- Drying of a Pharmaceutical Formulation. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 60, 95–103.
106. Cooper, M., Paul, R., Shaw, K., Blower, P., 2011. Which bifunctional chelator for immunoPET with Cu-64? *J. Nucl. Med.* 52, 407–407.
107. Cooper, M.S., Ma, M.T., Sunassee, K., Shaw, K.P., Williams, J.D., Paul, R.L., Donnelly, P.S., Blower, P.J., 2012. Comparison of ⁶⁴Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability. *Bioconjug. Chem.* 23, 1029–1039.
108. Davies, A.J., 2007. Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I131 tositumomab. *Oncogene* 26, 3614–3628.
109. Delgado, J., Matutes, E., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Rafiq-Mohammed, F., del Giudice, I., Catovsky, D., 2003. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 120, 754–759.
110. DrugBank (Ed.), 2016. Rituximab. DrugBank.
111. Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L., 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* 7, 9–14.
112. Ekenlebie, E., Einfalt, T., Karytinis, A.I., Ingham, A., 2016. Pharmaceutical patent

- applications in freeze-drying. *Pharm. Pat. Anal.* 5, 407–416.
113. Gjorgieva Ackova, D., Smilkov, K., Janevik-Ivanovska, E., 2014. Formulation and Characterization of “Ready to Use” 1B4M-DTPA-rituximab for Lu-177 Labeling. *World J. Med. Sci.* 11, 535–540.
 114. Gjorgieva Ackova, D., Smilkov, K., Janevik-Ivanovska, E., Stafilov, T., Arsova-Saradinovska, Z., Makreski, P., 2015. Evaluation of non-radioactive lutetium- and yttrium labeled immunoconjugates of rituximab a vibrational spectroscopy study. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 34, 351–362.
 115. Jackson, K.A., 1999. The application of the population approach to pharmacokinetics in drug development.
 116. Jacobs, S.A., 2007. 90 Yttrium ibritumomab tiuxetan in the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma: current status and future prospects. *Biol. Targets Ther.* 1, 215.
 117. Janda, A., Bowen, A., Greenspan, N.S., Casadevall, A., 2016. Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function. *Front. Microbiol.* 7.
 118. Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* Sep;58(3):621-81
 119. Egli M. 2018. Advancing Pharmacotherapy Development from Preclinical Animal Studies. *Handb Exp Pharmacol.* 248:537-578.
 120. Lee, J., Cheng, Y., 2006. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J. Controlled Release* 111, 185–192.
 121. Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., Bayer, R., 2010. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs* 2, 480–499.
 122. Liu, S., 2008. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug Deliv. Rev., Delivery Systems for the Targeted Radiotherapy of Cancer* 60, 1347–1370.
 123. Ferreira IMPLVO, Mendes E, Ferreira MA. 2001. HPLC/UV analysis of proteins in a dairy products using a hydrophobic interaction chromatographic column. *Analytical Sciences*; 17:499-501.
 124. Tompkins J, Spurgeon T, Tobias R, Andres J, Butler-Roberts E, Adomaitis M. 2017. Validation of a dual wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect aggregates of a monoclonal antibody biotherapeutic. *Eurofins* . 12(8):9425-9.
 125. Chhetri HP, Thapa P, Schepdael AV. 2014. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 22:483-7.
 126. Bond MD, Pankel ME, Zhang Z, Wang D, Mehndiratta P, Zhao H, Gunton K, Ni A, Nedved ML, Burman S, Volkin DB. 2010. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion

HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99(6):2582-97.

127. Atkins, J.T., George, G.C., Hess, K. *et al.* 2020. Pre-clinical animal models are poor predictors of human toxicities in phase 1 oncology clinical trials. *Br J Cancer* **123**, 1496–1501
128. Saeidnia S, Manayi A, Abdollahi M. 2015. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Curr Drug Discov Technol*. 12(4):218-24
129. Garattini S, Grignaschi G. 2017 Animal testing is still the best way to find new treatments for patients. *Eur J Intern Med*. Apr;39:32-35